

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-509248

(P2002-509248A)

(43) 公表日 平成14年3月26日 (2002.3.26)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テーマト\* (参考)

G 0 1 N 21/05

G 0 1 N 21/05

2 G 0 5 7

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 79 頁)

(21) 出願番号 特願2000-540427(P2000-540427)  
 (86) (22) 出願日 平成11年1月19日 (1999.1.19)  
 (85) 翻訳文提出日 平成12年7月19日 (2000.7.19)  
 (86) 国際出願番号 PCT/SE99/00063  
 (87) 国際公開番号 WO99/36766  
 (87) 国際公開日 平成11年7月22日 (1999.7.22)  
 (31) 優先権主張番号 09/009, 139  
 (32) 優先日 平成10年1月20日 (1998.1.20)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), JP, US

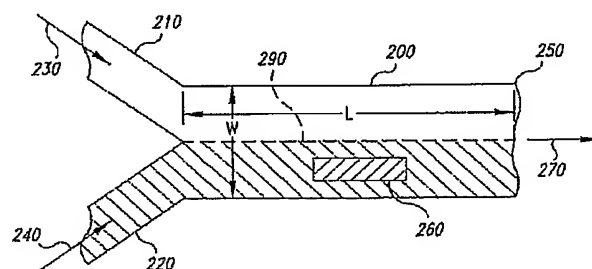
(71) 出願人 バイアコア アーベ  
 スウェーデン国 ウプサラ, エス-754  
 50, ラブスゲーテン 7  
 (72) 発明者 マルムクビスト, マグナス  
 スウェーデン国 エス-752 57 ウプサ  
 ラ, レーベックスベージェン 39  
 (72) 発明者 ロース, ホーカン  
 スウェーデン国 エス-752 34 ウプサ  
 ラ, オスロガータン 85  
 (74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 感知面における層流のための方法および装置

(57) 【要約】

フローセル (200) 内での感知面を過ぎて流体フローを制御する方法および装置を提供する。これらの方法は、層流法を使用し、このフローセルの感知面上に1個またはそれ以上の別個の感知領域 (260) を過ぎる流体フローを配置する。このような方法によって、これらの別個の感知領域の選択的な感作が可能となり、そしてこれらの別個の感知領域と試料流体フローとの選択的な接触を与える。この別個の感知領域上でのリガンドの固定化に続いて、この試料流体フロー内に含まれる分析物との選択的な接触により、広く多様な方法による分析が可能となる。また、感作感知面、およびセンサ装置およびシステムも提供される。



**【特許請求の範囲】**

**【請求項1】** フローセル内に液体フローを通過させるために配列された、感知面を感作する方法であって、該方法は以下：

第一感作流体の層流および該第一感作流体のフローに隣接した第二流体の層流を提供し、該2本の層流体は、互いに対する界面を有する該感知面を過ぎて、同じ方向で共に流れるようにする工程であって、ここで、該界面は、該フロー方向と平行であり、少なくとも、該第一感作流体は、該感知面を感作できる、工程；および

該第一感作流体および該第二流体の相対流速を調整して該界面を側方にずらし、その結果、該第一感作流体は、その選択的な感作のために、該感知面の別個の感知領域と接触する、工程、を包含する、方法。

**【請求項2】** 前記第二流体は前記感知面と相互作用せず、それによって、該感知面において感作領域および非感作領域を生じる、請求項1に記載の方法。

**【請求項3】** さらに工程において、前記第一感作流体は前記感知面と相互作用しない流体と置き換えられ、そして前記第二流体は、該第一感作流体と異なって該感知面を感作できる第二感作流体と置き換えられ、2個の異なる感作領域を生じ、該感作領域は、必要に応じて、該感知面上の非感作領域により、間隔を置いて配置される、請求項1に記載の方法。

**【請求項4】** 前記層流の前記相対流速は、前記界面を側方にずらし、前記感知面上にて勾配感作領域を提供するように変えられる、請求項1に記載の方法。

**【請求項5】** 前記層流の前記相対流速は、前記感知面上において連続的な勾配感作領域を提供するように連続的に変えられる、請求項1に記載の方法。

**【請求項6】** 前記第一感作流体の前記層流の他側において、第三流体の追加層流が提供され、その結果、該第一感作流体の該層流は、前記第二流体および該第三流体の該層流の間に挟まれる、請求項1に記載の方法。

**【請求項7】** 前記第二および第三流体は、前記感知面を感作することができない、請求項6に記載の方法。

【請求項 8】 前記方法を、少なくとも 1 種の異なる感作第一流体ならびに変化した相対流速を有する前記第二および第三流体を用いて繰り返し、前記感知面において、少なくとも 2 個の隣接した感作表面領域を提供する、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】 前記感知面の感作は、分析物特異的リガンドを該感知面に固定することを包含する、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】 前記分析物特異的リガンドは、抗原、抗体、抗体断片、オリゴヌクレオチド、炭水化物、オリゴ糖、レセプター、レセプター断片、リン脂質、タンパク質、ホルモン、アビジン、ビオチン、酵素、酵素基質、酵素インヒビターおよび有機合成化合物からなる群から選択される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】 前記第一感作流体は、前記感知面上の領域を感作し、そして第二感作流体は、該第一感作流体の方向に対して横向きに適用され、該感知面上において、重なり合った感作領域を生じる、請求項 1 または 6 に記載の方法。

【請求項 12】 前記第一感作流体は、前記感知面上の領域を感作し、そして少なくとも 2 種の異なる第二感作流体は、該第一感作流体の方向に対して横向きに適用され、該感知面上において、少なくとも 2 個の重なり合った感作領域を生じる、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】 少なくとも 2 種の異なる第一感作流体が、前記感知面にて、少なくとも 2 個の平行領域を感作し、そして少なくとも 2 種の異なる第二感作流体が、該第一感作流体の方向に対して横向きに適用され、該感知面上にて、重なり合った感作領域のマトリックスを生じる、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】 前記第一感作流体または前記第二感作流体の少なくとも前記リガンドは、分析物特異的リガンドである、請求項 11～13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】 前記分析物特異的リガンドは、抗原、抗体、抗体断片、オリゴヌクレオチド、炭水化物、オリゴ糖、レセプター、レセプター断片、リン脂質、タンパク質、ホルモン、アビジン、ビオチン、酵素、酵素基質、酵素インヒビターおよび有機合成化合物からなる群から選択される、請求項 14 に記載の方

法。

【請求項16】 前記第一感作流体または前記第二感作流体の少なくとも前記リガンドは、二官能性リガンドである、請求項11～13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項17】 前記感作は、化合物合成を達成するための化学部分の連続的付加を構成する、請求項1～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】 前記感作は、ペプチドあるいはオリゴヌクレオチド合成を達成するためのペプチドまたはオリゴヌクレオチド部分の連続的付加を構成する、請求項1～17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】 分析物用の流体試料を分析する方法であって、該方法は、請求項1～16のいずれか1項に記載の方法に従って、感知面上の別個の感知領域を感作する工程、該感知面を該流体試料と接触させる工程、および該分析物と該感知領域との間の相互作用を検出する工程を包含する、方法。

【請求項20】 前記感知面上の少なくとも1個の非感作領域は、参照として使用される、請求項19に記載の方法。

【請求項21】 前記感知面上の少なくとも1個の感作領域は、参照として使用される、請求項19に記載の方法。

【請求項22】 分析物用の流体試料を分析する方法であって、該方法は、以下：

付随した感知面を有するフローセルを提供する工程であって、ここで、該感知面はその上に、少なくとも2個の別個の感知領域を有する、工程；および

層流状態での第二流体と共に該流体試料を、層流状態にて、該フローセルに通過させることによって、該流体試料を該別個の感知領域の少なくとも1個と選択的に接触させる工程であって、その結果、該2本の層流体は互いの界面と共に該フローセルを通過して同じ方向で共に流れ、ここで、該界面は該フロー方向と平行であり、そしてここで、該少なくとも1個の別個の感知領域との選択的接触は、該流体試料および該第二流体の相対流速を調整し、該界面を側方にずらすことで制御される、工程、

を包含する、方法。

【請求項23】 前記流体試料は前記第二流体と共に、そしてさらに、前記試料流体のフローの外側に位置している第三流体と共に、層流状態で前記フローセルを通り、該試料流体の該層流は、該第二流体と第三流体との間に挟まれるようにされる、請求項22に記載の方法。

【請求項24】 前記試料流体および前記第二フローの前記相対流速は、該試料流体を、以前に該試料流体と接触しなかった前記少なくとも2個の別個の感知領域の1個と接触させるように調整される、請求項22に記載の方法。

【請求項25】 前記第二流体および前記第三フローの前記相対流速は、前記試料フローを、以前に該試料流体と接触しなかった前記少なくとも2個の別個の感知領域の1個と接触させるように調整される、請求項23に記載の方法。

【請求項26】 前記少なくとも2個の別個の感知領域の1個は、感作した感知領域である、請求項22または23に記載の方法。

【請求項27】 前記少なくとも2個の別個の感知領域の1個は、感作した参照領域である、請求項22または23に記載の方法。

【請求項28】 前記少なくとも2個の別個の感知領域の1個は、非感作参照領域である、請求項22または23に記載の方法。

【請求項29】 前記非感作領域は、以前に感作した感知領域である、請求項28に記載の方法。

【請求項30】 請求項22～29のいずれか1項に記載の方法であって、さらに、以下：

第一状態において、前記層流間に前記界面を配置するため、該層流の前記相対流速を設定し、前記試料流体は前記感知領域と接触しないように流れる、工程；

第二状態において、該界面を側方にずらすため、該層流の該相対流速を変え、その結果、該試料フローは該感知領域と接触する、工程；および

該試料フロー中の分析物の該感知領域との会合を測定する、工程、を包含する、方法。

【請求項31】 請求項22～29のいずれか1項に記載の方法であって、さらに、以下：

第一状態において、前記層流間に前記界面を配置するため、該層流の前記相対流速を設定し、前記試料流体が前記感知領域と接触するように流れる、工程；

第二状態において、該界面を側方にずらすため、該層流の該相対流速を変え、その結果、該試料フローは該感知領域と接触しない、工程；および

該感知領域からの分析物の解離を測定する、工程、  
を包含する、方法。

【請求項32】 以下を包含する、システム：

フローセルであって、該フローセルは、入口末端および出口末端、該入口末端と該出口末端との間に位置する該フローセル内の壁面に少なくとも1個の感知面を有し、ここで、該フローセルは、該入口末端にて、少なくとも2個の入口開口部を有し、また、該出口末端にて、少なくとも1個の出口開口部を有し、該各個の入口開口部を通して該フローセルに入る別個の層流は、該フローセルを通して、該感知面を過ぎて、同じ方向に並行して流れることができるようにされる、フローセル；

該入口開口部を通して流れる層流体を適用するための手段であって、該層流体は、互いの界面と共に、該感知面を過ぎて、並行して、該フローセルを通して流れ、該界面は、該層流体が流れる方向と平行である、手段；および

該層流の前記相対速度を変え、該感知面を過ぎて該界面を側方にずらすための手段。

【請求項33】 前記フローセルは、2個の入口開口部および少なくとも1個の出口開口部を有する、請求項32に記載のシステム。

【請求項34】 前記フローセルは、該フローセルを通るサンドイッチ様式で、3本の隣接層流を確立できるように、3個の入口開口部および少なくとも1個の出口開口部を有する、請求項32に記載のシステム。

【請求項35】 前記フローセルは、さらに、前記入口末端と前記出口末端との間の流体経路に対して基本的に横向きに配列された少なくとも2個の追加入口開口部および少なくとも1個の追加出口開口部を有する、請求項33または34に記載のシステム。

【請求項36】 前記感知面は、前記フローセル内に回転可能に取り付けら

れる、請求項33～35のいずれか1項に記載のシステム。

【請求項37】 前記感知面は、その上に少なくとも2個の別個の感知領域を有する、請求項32に記載のシステム。

【請求項38】 前記少なくとも2個の別個の感知領域の1個は、参照領域である、請求項37に記載のシステム。

【請求項39】 前記少なくとも2個の別個の感知領域の1個は、分析物と特異的に相互作用できる、請求項37に記載のシステム。

【請求項40】 請求項32～39のいずれか1項に記載のシステムであって、さらに以下：

前記感知面上での相互作用現象を検出するための検出手段、  
を包含する、システム。

【請求項41】 前記検出手段が、光学センサを包含する、請求項40に記載のシステム。

【請求項42】 前記光学センサが、エバネセント波感知に基づく、請求項41に記載のシステム。

【請求項43】 前記光学センサが、SPRセンサである、請求項41に記載のシステム。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## (発明の分野)

本発明は、一般に、フローセル内の感知面を過ぎる流体フローの制御に関し、より詳細には、流体フローをフローセル内の1個以上の別個の感知面上に配置するための層流技術の使用、ならびに感知面の調製およびそれに関連した分析法、装置およびシステムにおけるそれらの使用に関する。

## 【0002】

## (発明の背景)

リアルタイムBiomolecular Interaction Analysis (BIA) 用の器具類は、BIAcore (以下、「BIAcore 器具」と呼ぶ) の商品名で、Biacore AB (Uppsala, Sweden) から市販されている。このBIAcore 器具は、センサチップの表面にある分子間の相互作用を研究するために、表面プラズモン共鳴 (SPR) を使用し、そして液体取扱および光学システム、センサチップ、ならびに制御およびデータ評価用のコンピューターを備える処理ユニットを含む。ある分子 (これは、「リガンド」と呼ばれる) は、このセンサチップの表面上に固定され、そして他の分子 (「分析物」) は、このセンサチップの表面上を流れる。この分析物が固定リガンドと相互作用するとき、SPRは、このセンサチップの表面上の屈折率の変化を測定するのに使用される。分析物の固定リガンドに対する選択的相互作用により、この技術が特異的になり、また、複雑な混合物中の相互作用の分析が可能になる。

## 【0003】

このBIAcore 器具は、広範に使用されており、その操作および適用性に関係した多数の文献が出版されている。例えば、公開されたPCT WO 90/05295は、このBIAcore 器具の構成および操作を非常に詳細に開示し、一方、公開されたPCT出願WO 90/05303およびWO 90/05305は、それと共に使用するための種々のセンサ面に関する。さらに、BIAcore ABにより出版されたthe BIA technology, B I



Application, and BIAcore Handbooksは、このBIAcore器具の操作および構成をかなり詳細に記述している。

#### 【0004】

一般に、液体試料内に存在する分析物は、例えば、このセンサチップの表面に結合したデキストランマトリックスと会合したリガンドと相互作用する。リガンドによる分析物の結合により、屈折率の増加が起こり、これは、SPRにより測定される共鳴角の変化によりリアルタイムでモニターされる。このデータは、時間の関数として、共鳴ユニット(RU)での信号をプロットするセンサグラム(sensorgram)の形態をとる。1,000RUの信号は、1mm<sup>2</sup>あたり、約1ngの分析物の結合に相当している(Johnssonら、Anal. Biochem. 198:268~277, 1991; Fagerstromら、J. Chromatography 597:397~410, 1992; Stenbergら、Colloid and Interface Science 143:513~526, 1991)。

#### 【0005】

BIAcore器具の操作中にて、試料は、一体型マイクロ流体カートリッジ(IFC)を利用するセンサチップに送達される。このIFCは、硬質シリコンポリマープレートにある一連の精密鑄造チャンネルからなり、緩衝液および試料の送達用の試料ループおよびフローチャンネルを形成する。IFCは、BIAcore器具内のドッキング機構により、センサチップと接触して押し付けられる。BIAcore器具により使用される代表的なIFCは、図1Aで描写されており、これは、(上から見た)チャンネルおよび弁を図示しており、差込図は、同じものの側面図を示し、IFCをセンサチップに押し付けることにより形成されるフローセルを描写している。

#### 【0006】

IFCを通る試料フローは、一組の空気式に作動したダイヤフラム弁(これは、試料を、種々のチャンネルを通して、センサチップの感知面に向ける)により、制御される。このようにして、このBIAcore器具(例えば、BIAcore 2000)により、4個までのフローセル内の単一または複数チャンネル分

析が可能になる。例えば、図1Bは、直列した3個のフローセルを通過する試料を図示している(標識したFC1、FC2およびFC3)。図1Bでは詳細に描写されていないものの、試料もまた、分析用の単一フローセルをちょうど通過し得る(例えば、FC1)。

#### 【0007】

現存のBIAcore器具は、 $0.05 \times 0.5$  mmの断面積および2.4 mmの長さを有するフローセルを使用し、これは、約60ナノリットル(nl)の容積を与え、そして各フローセルにておよそ $1.2 \text{ mm}^2$ の全感知表面積を有する。集束入射光は、各フローセルに対して、感知面の長さのおよそ1.6 mmを照射し、検出器は、感知面の幅の約0.17 mmを画像化する。これは、各フローセル内にて、約 $0.3 \text{ mm}^2$ の感知領域に相当している。BIAcore器具中の各フローセルは、単一感知領域を含む。それゆえ、もし、この試料を4個の異なる感知領域と接触させる場合、4個の別個のフローセルを通る試料の通過が必要である(すなわち、FC1、FC2、FC3およびFC4)。

#### 【0008】

このBIAcore器具で現在使用されている複数のフローセルへの試料送達には、非常に多くの利点を与え、そして試料送達技術に関して、当該技術分野の状況を代表しているものの、依然として、その改良が望まれている。例えば、動力学的な測定に関連して、試料-緩衝液境界での分散を最小にして、明確な容積または「プラグ(plug)」で、試料を各フローセルに送達することが重要である。このような試料プラグは、空気式弁の助けを借りて、このIFCにて、試料と緩衝液のフローとの間の切り換えにより作成される。分散は、これらの弁とフローセルとの間の死容積を小さく保つことにより、最小にされるものの、試料導入の開始および終了において静止期間が存在し、この場合、この試料の濃度は、分散により希釈される(すなわち、このシステムを流れている緩衝液とこの試料との混合)。さらに、分散は、直列したフローセルの数と共に、大きくなる(図1Bで描写するように)。このような分散の結果、この試料の導入の開始および終了時点にて、センサグラムの上昇および下降の両方に時間のずれが生じる。これらのいわゆる「上昇および下降時間(rise and fall time

s)」は、速い反応速度 ( reaction kinetics ) ( すなわち、高い反応速度定数での相互作用 ) を決定する性能を制限する。この制限を解決する1つの方法は、流速を増加することである。残念なことに、流速の増加は、高い試料消費を意味する。例えば、流速の上限を与える液体圧力によって、実用上および設計上の限界がある。

#### 【0009】

さらに、フローセル間の温度変化は、試料分析に対して悪影響を与え得る。感知面に対する分析物の屈折率、反応速度および質量輸送は、全て、温度に感受性であるので、このような測定は、制御された温度で行うことが重要である。これらのフローセル ( 故に、感知面 ) の物理的な分離のために、フローセル間の温度変動は、測定誤差の原因であり得る。さらに、図1Aおよび1Bで描写されたフローセルは、単一フローセル内の別個の領域への制御された試料送達ができず、また、異なるリガンドを単一フローセル内の別個の感知領域に固定化することもできない。むしろ、このような改変は、別個のフローセル内で達成されるにすぎず、それゆえ、上で述べたような限界を伴う。

#### 【0010】

従って、当該分野において、フローセルベースの検出器具 ( 例えば、Bioore 器具 ) に関連した改良された試料送達技術、および類似の設計または操作の他の器具が必要とされている。その目的のために、フローセルベースの感知構造に関係する特性の測定可能な変化を検出する任意の器具は、改良された試料送達技術から利益を受け得る。このような改良は、試料と緩衝液との間の速い液体交換速度を与え、複数の感知領域を横切る一定の温度制御を維持し、そしてこのフローセル内の複数の感知領域への種々の試料送達技術を可能にするべきである。

#### 【0011】

本発明は、これらの必要性を満たし、さらに関連した利点を提供する。

#### 【0012】

( 発明の要旨 )

要約すると、本発明は、フローセル内の感知面を過ぎる流体フローの制御に関

し、より詳細には、このフローセル内での1個以上の別個の感知領域上に流体フローを配置するために、層流技術を使用することに関する。より詳細には、少なくとも2本の層流の個々の流速を変えることにより、これらの2本のフロー間の界面は、このフローセル内の感知面を超えて、側方に移動され得る。このようにして、これらのフローは、1個以上の別個の感知領域を超えて、フローセル内に制御可能に配置され得、さらに、これらの別個の感知領域において、広範囲の表面修飾および/または相互作用を可能にする。

#### 【0013】

本発明の1局面は、液体フローによって通過させるように配列された感知面を感作する方法を提供する。「感作する(sensitizing)」との用語は、この感知面を所望の分析物と特異的に相互作用し得るようにする感知面の任意のプロセスまたは活性化を意味する。この方法は、第一流体の層流および該第一流体のフローに隣接した第二流体の層流を供給して、その結果、これらの2本の層流が、互いの界面と共に、この感知面を超えて、共に通過する工程を包含し、少なくとも、この第一流体は、この感知面を感作し得、そしてこれらの2本の層流の一方または両方の相対流速を調整して、この界面をこれらのフロー間に配置し、その結果、各層流がその選択的な感作のために、この感知面の規定領域と接触する。

#### 【0014】

1実施態様では、感知面は、この表面を、それを感作する第一流体、およびこの表面を感作しない第二流体と接触させることにより、感作される。この実施態様の異形において、この手順は、第一流体が、この感知面を感作しない流体で置き換えられるように、そして、第二流体が、第一流体と異なって感知面を感作できる第二流体で置き換えられて、2個の異なる感知領域(これらは、必要に応じて、この感知面の非感作領域から離れてまたはそれと隣接して、間隔を置かれている)を生じるように、繰り返される。他の実施態様において、これらの層流の相対流速を変えて、界面を側方にずらし、この感知面上にて、勾配感作領域を提供することにより、あるいは、層流の相対流速を連続的に変えて、連続的な勾配感作領域を作成することにより、段階的な勾配が生じ得る。

## 【0015】

さらに別の実施態様において、第一流体のフローの他の側面にて、第三流体の追加層流が供給され、その結果、第一流体の層流が、第二流体の層流と第三流体の層流との間に挟まれる。これにより、第一流体のフローを感知面上にて、側方に配置することが可能となる。もし、第二および第三流体（これらは、同一または異なる液体であり得る）が、この感知面を感作できないなら、1層または1列の感作流体が、この感知面上に制御可能に配置され得る。少なくとも1種の異なる感作第一流体を用いて、第二および第三流体の様々な相対流速で、上記手順を繰り返すことにより、この感知面上には、2列以上の感作領域が提供され得る。

## 【0016】

さらに別の実施態様において、この方法は、この感知面上にて、1列または1マトリックスの感作領域を生成するために使用される。これは、この手順を異なる感作流体（単数または複数）を用いて繰り返すことにより、そして初期フロー方向に対して、ある角度（典型的には、横に）でこの層流を適用することにより、達成され得る。このような列またはマトリックスは、以下でさらに詳述するような多数の有益な適用を有する。

## 【0017】

本発明の別の局面は、1個以上の分析物に対する流体試料を分析する方法を提供する。この方法は、本明細書中に記載された方法により分析物特異的リガンドを感知面に固定することによって感知面を感作する工程、この感知面を流体試料と接触させる工程、およびこの流体試料中の分析物とこの感知面の感作領域（単数または複数）との相互作用を検出する工程を包含する。参照領域（単数または複数）として、1個以上の非感作領域が使用され得、あるいは、コントロールリガンドで感作された1個以上の領域が用いられ得る。

## 【0018】

本発明のさらに別の局面は、分析物用の流体試料を分析する方法を提供し、この場合、この流体の層流は、所望の感知面（単数または複数）上に、この試料フローを配置するためにある。この方法は、以下を包含する：フローセルの感知面

上に感作領域を提供する工程であって、この感作領域は、この分析物と選択的に相互作用し得る工程；流体試料の第一層流を、この感知面を超えて通過させるが、感知領域とは接触しない工程；この感知面を超えて、この感作領域と相互作用できない流体の第二層流を通過させる工程であって、この第二層流は、第一層流と隣接しており、それと界面を形成する工程；流体試料の第一層流がこの感作領域を超えて通過するように、第一および / または第二層流の相対流速を調整する工程；およびこの感作領域に接触した際、この流体試料中の分析物の相互作用を検出する工程。

#### 【0019】

本発明の別の局面は、流体試料を分析物について分析する方法を提供し、この場合、その全感知面が感作され、そしてこの感作面の一部だけが、この試料フローと接触されるのに対して、他の部分は、参照領域として使用される。このようにして、この感知面上の浸出ならびに他の制御できない事象が参照され得る。この方法は、この分析物と選択的に相互作用し得る感作面を提供する工程；感作面の第一部分（すなわち、第一感知領域）を超えて、流体試料の第一層流を通過させる工程；同時に、感作面の残り（すなわち、第二感知領域）を超えて、この感作面と相互作用できない流体の第二層流を通過させる工程であって、ここで、第二層流は、第一層流と隣接しており、そして第二感知領域は、参照領域として役立つ工程；および流体試料中の分析物と第一感知領域との相互作用を検出する工程、を包含する。さらなる実施態様において、第一および / または第二層流の相対流速は、第一層流が第二感知領域の少なくとも一部を通過するように、調整され、そして、この試料フロー中の分析物の相互作用は、第二感知領域の新たな接触部分で、検出される。

#### 【0020】

本発明のさらに他の局面は、感知面への、またはそこからの分析物の会合または解離を研究する方法を提供し、この場合、層流技術は、フローセル中で試料フローを、試料フローが感作感知領域と接触する位置まで側方に急速にシフトするために使用される。この会合を研究するための方法は、その感知面上に感作感知領域（これは、この分析物と相互作用し得る）を有するフローセルを提供する工

程；フローセルを通過して、第一層流中の流体試料を通過させる工程；フローセルを通過して、第二層流中の分析物を含有しない流体を通過させる工程であって、第二層流は、第一層流と隣接しており、それと界面を形成する工程；この試料流体フローが感作感知領域と接触しないように、これらの層流間に界面を配置するために、流体フローの相対流速を設定する工程；試料フローがこの感作感知領域と接触するように、この界面を側方にずらすために、層流の相対流速を変える工程；および分析物の感作感知領域との会合を測定する工程、を包含する。同様に、この解離を研究する方法は、試料フローがもはやこの感作感知領域と接触しないように、この試料フローを側方にシフトする工程；およびこの感作感知領域からの分析物の解離を測定する工程を包含する。

#### 【0021】

本発明のさらに別の局面は、以下を備えるセンサ装置を提供する：入口末端および出口末端を有するフローセル；入口末端と出口末端との間に配置されたフローセル内の壁面上の少なくとも1個の感知面；ここで、このフローセルは、この入口末端にて、少なくとも2個の入口開口部を有し、また、この出口末端にて、少なくとも1個の出口開口部を有し、その結果、各個の入口開口部を通過してフローセルに入る別個の層流は、並んでこのフローセルを通過して流れ、感知面を接触し得る。このセンサ装置の1実施態様において、このフローセルは、2個の入口開口部および少なくとも1個の出口開口部を有し、そしてYフローセル型（すなわち、2個の入口および単一の出口を有する）である。別の実施態様において、このフローセルは、このフローセルを通るサンドイッチ様式で、3本の層流フローを確立できるように、3個の入口開口部および少なくとも1個の出口開口部を有し、そしてWフローセル型（すなわち、これは、3個の入口および単一の出口を有する）である。

#### 【0022】

さらに別の実施態様では、フローセルは、二次元型である。このような二次元フローセルの一異形は、少なくとも2個の第一入口および少なくとも1個の第一出口を有し、それらの間の流体経路と角を成す関係で（通常、横に）、少なくとも2個の第二入口および少なくとも1個の第二出口を有する。この型の代表的な

フローセルは、二次元セルである。二次元フローセルの別の異形は、このフローセル内に回転可能に取り付けられた感知面を有し、これはまた二次元の流体フローにより通過され得る。この感知面は、このフローセルのフロー方向にて、少なくとも2個の隣接感知領域（特に、少なくとも1個の感知領域および少なくとも1個の参照領域）を有し得る。好ましくは、少なくとも1個の感知領域が、分析物と特異的に相互作用し得る。

#### 【0023】

本発明のさらに別の局面は、以下を備えるセンサシステムを提供する：入口末端および出口末端を有するフローセル；入口末端と出口末端との間のフローセル内の感知面上の少なくとも1個の感知領域；フローセルであって、入口末端にて、少なくとも2個の入口開口部を有し、そしてこの出口末端にて、少なくとも1個の出口開口部を有するフローセル；この入口開口部を通過して流れる層流体を適用するための手段であって、この層流体が並んでこの感知面を超えて、フローセルを通過して通過する手段；この流体の層流の相対流速を変えて、感知領域（単数または複数）を含む感知面上の層流の各個の側方拡張を変えるための手段；および感知領域（単数または複数）での相互作用現象を検出するための検出手段。

#### 【0024】

本発明のこれらおよび他の局面は、添付の図面および以下の詳細な説明を参照すると、明らかとなる。さらに、本明細書中では、明瞭にし完全にする目的のために、特定の参考文献が引用される。このような参考文献は各々、本明細書中全体で参考として援用されている。

#### 【0025】

##### （発明の詳細な説明）

上で言及したように、本発明は、一般に、流体（これはまた、本明細書中では、「試料フロー」または「試料」とも呼ばれる）を感知面上の1個以上の別個の領域（「感知領域（sensing areas）」と呼ぶ）と接触させるために、層流技術を用いて、感知面を超える流体フローを制御すること、感知面の作製、およびその分析方法、それらに関する装置およびシステムに関する。感知面の作製に関連して、リガンドは、感知面の別個の感知領域を、フローセル内で、



層流状態にて、リガンドを含有する試料と選択的に接触させることにより、この感知面上の別個の感知領域と会合され得る（これは、本明細書中では、「感作（sensitization）」と呼ぶ）。本発明のフローセルの構成および寸法は、特定の適用および/または検出方法に依存して、広範に変わり得る。

#### 【0026】

この目的のために、代表的な検出方法には、質量検出法（例えば、圧電、光学、熱光学および表面弾性波（SAW）法）、および電気化学法（例えば、電位差測定、電気伝導度測定、電流測定および静電容量法）が挙げられるが、これらに限定されない。光学検出法に関して、代表的な方法には、質量表面濃度（mass surface concentration）（例えば、反射光学法（内部反射法および外部反射法の両方を含む））、角度、波長または分解した位相（例えば、楕円偏光法およびエバネセント波分光法（EWS））を検出する方法が挙げられ、後者には、表面プラズモン共鳴（SPR）分光法、ブルースター角屈折率測定法、臨界角屈折率測定法、減衰全反射法（FTIR）、エバネセント波楕円偏光法、散乱全反射法（STIR）、光学導波管センサ、エバネセント波ベースの画像化（例えば、臨界角分解画像化、ブルースター角分解画像化、SPR角分解画像化など）が含まれる。さらに、例えば、エバネセント蛍光（TIRF）およびリン光に基づいた光度測定法もまた、導波管干渉計と同様に、使用され得る。本発明は、本明細書中後に、SPR分光法に関連して説明されているものの、本発明は、このように限定されないことを理解すべきである。むしろ、試料を層流状態にてフローセル内で感知面と接触させる任意の器具または方法は、本発明により、有利となり得る。

#### 【0027】

上で言及したように、本発明は、試料を、フローセル内で、層流状態にて、感知面上の1個以上の別個の感知領域と接触させる工程を包含する。本明細書中で使用する「層流」との用語は、2000より低いレイノルズ数、好ましくは、20より低いレイノルズ数に相当する。レイノルズ数（Re）は、感知面を超える流体フローの特性を記述するために使用され、そして以下の等式（1）により表わされ得る：

【0028】

【数1】

$$R_e = \frac{Vd\rho}{\mu} \quad (1)$$

ここで、Vは、平均線形流速 (m / s) であり、dは、「パイプ」の直径 (m) であり、ρは、流体の密度 (kg / m<sup>3</sup>) であり、そしてμは、流体の絶対粘度 (Ns / m<sup>2</sup>) である。長方形の断面を有するフローセルに関連して、このパイプの直径は、さらに適切には、液圧直径 (D<sub>h</sub>) で置き換えられ、これは、このフローセルの周の長さで割ったその断面積の4倍で与えられる (すなわち、D<sub>h</sub> = 2wh / (w + h) であり、ここで、wおよびhは、それぞれ、このフローセルの幅および高さである)。それゆえ、長方形の断面を有するフローセルのレイノルズ数は、さらに正確には、等式 (2) により、表わされ得る：

【0029】

【数2】

$$R_e = \frac{VD_h\rho}{\mu} \quad (2)$$

等式 (2) は、この感知面が、理想的に、滑らかであり、湾曲が無視できると仮定していることに注目すべきである。それゆえ、このフローセル内でのいずれの凹凸、表面の顕著な湾曲または鋭い曲がりは、局所的な乱流を引き起こすので、回避すべきである。さらに、このフローセル内の層流は、この流体入口からフローセルへの一定距離で、最もうまく達成される。この目的のために、WeberおよびPrudy (Anal. Chim. Acta 100:531, 1978) は、フローセル入口からの距離 (L<sub>e</sub>) で、層流を確保するために、以下

の等式(3)を提案した:

【0030】

【数3】

$$L_e \approx 0.05 \cdot Re D_h \quad (3)$$

上記の発明の背景の箇所で言及したように、フローセルベースの測定の上昇および下降時間(すなわち、試料濃度を感知面にわたって、0%から100%まで上げ、次いで、0%まで下げ戻すのにかかる時間)は、速い反応速度を分解する性能を限定する。試料導入の開始時点および終了時点では、この試料は、キャリア溶液(例えば、緩衝液)で分散することにより、希釈される。それゆえ、この試料の分散のために、瞬間的な上昇および下降時間よりもむしろ、一定の時間のずれが存在する。このような分散は、一次近似として、等式(4)に従った一次の動力学過程により、記述され得る:

【0031】

【数4】

$$\frac{dC}{dt} = k_{Lqx}(C_0 - C) \text{ or } \frac{dC}{dt} + k_{Lqx}C = k_{Lqx}C_0 \quad (4)$$

ここで、 $k_{Lqx}$  は、液体交換速度定数であり、 $C_0$ は、試料の濃度であり、そして  $C$  は、感知面での試料の濃度である。

【0032】

BIAcore器具において、この感知面での試料の濃度  $C$  は、このフローセル内での分散により、支配される。等式(4)に積分因子  $e^{-k_{Lqx}t}$  を掛けて、それを積分することにより、以下の等式(5)が得られる:

【0033】

【数5】

$$C = C_0 (1 - e^{-k_{Lx} t}) \quad (5)$$

この等式は、液体交換中にて、この感知面で、この試料濃度の上昇をほぼ記述している。この液体交換に必要な時間は、例えば、その最終値の99%に達する時間として、規定され得る。故に、等式(5)を用いて、上昇時間は、等式(6)により表わされ得る：

【0034】

【数6】

$$0.99 = \frac{C}{C_0} = (1 - e^{-k_{Lx} t}) \Rightarrow \text{上昇時間} = t_{0.99} = \frac{4.6}{k_{Lx0.99}} \quad (6)$$

それゆえ、もし、99%までの上昇時間が既知であるなら、この液体交換速度定数 $k_{Lx}$ は、等式(6)から計算され得る。同様に、下降中での液体交換についての一次式は、等式(7)により記述される：

【0035】

【数7】

$$C = C_0 \cdot e^{-k_{Lx} t} \quad (7)$$

これにより、プラトー水平域値の1%へと下降するのにかかる時間について、以

下の等式(8)が得られる:

【0036】

【数8】

$$0.01 = (e^{-k_{Lq}t}) \Rightarrow \text{下降時間} = t_{0.01} = \frac{4.6}{k_{Lq \times 0.01}} \quad (8)$$

上昇時間(または下降時間)と流速との間の実験的な関係を得るために、定常状態濃度の99%への上昇時間(または0.01%への下降時間)が測定され得、そして等式(9)に従って、試料フローに対して、プロットされ得る:

【0037】

【数9】

$$\text{上昇時間} = \frac{V_a \cdot 60}{\text{試料フロー}} \quad (9)$$

ここで、 $V_a$ は、流体の交換中に移動しなければならない試料の容量( $\mu$ l)に相当する。等式(9)において、試料フローは、1単位時間あたりの試料容量( $\mu$ l/分)として表わされ、そして上昇時間は、秒で測定される(それゆえ、60秒/分の変換が存在する)。本発明の代表的なフローセルについての実験結果は、実施例4で提示される。実験データから $V_a$ を決定することにより、等式(9)は、異なる試料フローについての上昇時間を計算するために使用され得る。

【0038】

さらに、等式(9)はまた、その初期濃度の99%まで上昇する時間についての式を得るのに、使用され得る。等式(6)および(9)を組み合わせると、液体交換速度定数は、等式(10)として表わされ得る:

【0039】

【数10】

$$K_{Lq} = \frac{4.6}{\left( \frac{V_a \cdot 60}{\text{試料フロー}} \right)} \quad (10)$$

適切な条件下にて、この等式は、異なるフローセルについての液体交換速度定数を計算するのに使用され得る。 $K_{Lq}$  が大きくなる程、測定し得る反応速度はより速くなる。液体交換速度の比較は、本発明の代表的なフローセルを通る異なる流速について、実施例4で提示される。

【0040】

本発明を実施する際に使用する適切なフローセルに関して、このようなフローセルは、多数の形状を呈し得、その設計は、意図した適用および/または使用に依存して、広範に変わり得る。本明細書中では、例示の目的のために、いくつかの代表的なフローセルが開示されているものの、層流状態にて液体試料を感知面と接触し得る任意の型のフローセルが、本発明を実施する際に、使用され得ることに認識すべきである。

【0041】

1実施態様において、本発明のフローセルは、2個の入口および1個の出口を有し、その結果、2本の液体ストリームが、それらの各個の入口を経由して、このフローセルに入り、そして層流状態にて、このフローセルを通して並行して移動し、出口を出ていく。このフローセルの内部容量の壁部分に沿って、感知面が位置し、その結果、少なくとも1本の流体フローがこの感知面と接触する。この実施態様の代表的なフローセルは、図2Aおよび2Bで描写されており、そして本明細書中では、「Yフローセル」と呼ばれる。

【0042】

図2Aを参照すると、Yフローセル200の断面図が図示されており、これは、入口アーム210および220および出口末端250を有する。このフローセルは、内部長さl、幅wおよび高さh(図示せず)を有する。第一流体(例えば、緩衝液)は、矢印230で描写されており、入口210を経由して、フローセ

ル200に入り、そして、第二流体(例えば、試料)は、矢印240により描写されており、入口220を経由して、入る(図2Aでは、第二流体240は、例示の目的のために、陰影を付けられている)。第一および第二流体は、層流状態にて、このフローセルの長さ1を移動し、その結果、界面290は第一流体230を第二流体240から離し、両方の流体は、矢印270により描写されるように、このフローセルの出口末端250を出ていく。

#### 【0043】

代表的なYフローセルの等角図が、図2Bに図示される。この図では、Yフローセル201は、入口アーム235および245を有し、各々は、それぞれ、入口215および225を備え、そして共通出口255を有する。第一流体は、矢印265により表わされ、入口215を経由して、このフローセルに入るのに対して、第二流体は、矢印275により表わされ、入口225を経由して、このフローセルに入る。これらの2本の流体は、界面295が第一流体265を第二流体275から離すように、層流状態にて、出口255の方向に移動して、両方の流体は、矢印285により描写されるように、出口255を出ていく。

#### 【0044】

これらの2本の流体が、図2Aおよび2Bで図示されたYフローセルを通して移動する場合、これらの流体の少なくとも1本は、図2Aおよび2Bにて、それぞれ、感知領域260および261により描写されるように、このフローセルの内部容量内の壁部分に沿って、別個の感知領域と接触する。流体と感知領域との間の相互作用は、以下でさらに詳細に述べるように、種々の相互作用を包含し得る。このような相互作用は、この感知領域を「裏面」(すなわち、この流体と接触している感知領域とは反対側)から精査する当業者に公知の感知技術により、検出され得る。あるいは、このような相互作用は、この感知領域を「前面」(すなわち、この流体と接触している感知領域の側)から精査する感知技術により、検出され得る。このような検出は、この流体がこの感知領域と接触しているのと同時に、またはそれに引き続いたある時点で行われ得、そして、この感知領域がこのフローセルに会合しているかまたはそこから解離している間に、行われ得る。

## 【0045】

少なくとも2本の層流を使用することにより、この流体を、制御した様式で、このフローセル内に案内することが可能となり、それにより、第一流体（例えば、試料）は、このフローセル内にて、感知領域と選択的に接触する。例えば、図3Aは、図2Aのフローセル200と類似したフローセル300を描写しているが、感知領域320は、大体、フローセルの中心線に沿って位置している。この実施態様において、界面の移動または転置は、この試料フローを感知領域と接触させるのに使用され得る。より詳細には、試料フロー（これは、矢印350により表わされる）および緩衝液フロー（これは、矢印340により表わされる）は、このフローセルに入り、層流状態にて、このフローセルの長さを移動し、そして矢印360により表わされるように、このフローセルを出ていく。例示の目的のために、試料フロー350は、陰影を付けられている。試料および緩衝液フローの流速は、界面380がこのフローセル内に位置され、この試料フローが感知領域320と接触しないように、選択される。試料および/または緩衝液の流速は、次いで、図3Bで示されるように、界面380の位置を界面381にずらすように調整され、それにより、試料フロー350は、感知領域320と接触される。この実施態様において、上で述べたように、上昇および下降時間は、界面の第一位置（この位置では、この感知領域と接触しない）（図3Aの界面380を参照）から第二位置（この位置では、この試料フローは、この感知領域と接触される）（図3Bの界面381を参照）への移動によってのみ、制限される。この界面が第一位置から第二位置へと移動するのに必要な試料の容量は、このフローセルそれ自体の容量の一部である。

## 【0046】

この実施態様の別の局面において、フローセル内では、複数の感知領域が使用され得る。図4Aで図示されているように、フローセル400は、試料フロー（矢印455により描写された陰影を付けた流体）、緩衝液フロー（これは、矢印465により描写されている）および界面470と共に、感知領域420および430を有し、その結果、試料フローは感知領域420または430のいずれにも接触しない。試料および緩衝液の流速は、次いで、界面471として図4Bで



表わすように、図4Aの界面470を、感知領域420および430との間の位置へと移動することにより、試料フロー455が感知領域430と接触するように調整される。この界面をこのように移動することの利点は、図3Aおよび3Bに関連して上で述べたとおりである。さらに、緩衝液フローと接触する感知領域420は、以下で述べる種々の目的(内部参照としての使用を含む)のために使用され得る。

#### 【0047】

本発明の別の実施態様において、2個より多い入口を有するフローセルが開示されている。この実施態様の代表例は、図5Aで示すような3個の入口を有するフローセルであり、これはまた、本明細書中では、「 $\Psi$ フローセル」とも呼ばれる。図5Aを参照すると、試料フロー(これは、矢印535により描写されている)は、中央入口531により、 $\Psi$ フローセル500に入る。第一フロー(これは、矢印525により描写されている)は、入口521を経由して、 $\Psi$ フローセル500に入り、そして第二フロー(これは、矢印545により描写されている)は、入口541を経由して入る。3本のフローの全ては、層流状態にて、並行して、このフローセルを通過して移動して、矢印565により表わされるように、このフローセルを出ていく。再度、例示の目的のために、中央フロー535および第一フロー525は、陰影を付けられている。従って、中央フロー(例えば、試料フロー)と第一および第二フロー(例えば、緩衝液フロー)との間に、2個の界面550および552が存在する。これらの3本のフローの相対流速を調整することにより、中央フローの位置および幅の両方は、選択的に制御され得る。例えば、図5Bで図示されるように、中央フロー535は、第一フロー525および第二フロー545の流速を適切に制御することにより、フローセルの下部側壁に向かって、移動され得る。従って、図5Aの界面550および552は、図5Bで示すように、それぞれ、位置551および553にシフトされる。

#### 【0048】

低い線形流速では、 $\Upsilon$ および $\Psi$ フローセルの両方を通るフローは、層流であり、そしてこれらの流体ストリームの活発な混合はない。この $\Upsilon$ フローセルに関連して、これらの2本の流体は、共通の流速で、このフローセルを通過し、そして

この界面の位置は、流入の流速により決定される。以下の等式(11)は、薄層フローセル(すなわち、長方形の断面を有し、 $w \gg h$ であるフローセル)での状況を記述している：

【0049】

【数11】

$$\text{界面} = w \cdot \frac{\text{第一フロー}}{\text{第一フロー} + \text{第二フロー}} \quad (11)$$

ここで、 $w$ は、フローセルの幅であり、そして $h$ は、フローセルの高さである。従って、第一および第二流速を変えることにより、この界面はこのフローセルの幅を横切って、移動され得る。

【0050】

$\Psi$ フローセルに関して、層流状態でのこれらの2個の界面(すなわち、「界面1」および「界面2」)の位置は、このフローセル中で、等式(12a)および(12b)により近似されるように、第一および第二流速(「第一緩衝液フロー」および「第二緩衝液フロー」)ならびに試料流速(「試料フロー」)を変えることにより、制御され得る。

【0051】

【数12】

$$\text{界面 1} = w \cdot \frac{\text{第一緩衝液フロー} + \text{試料フロー}}{\text{第一緩衝液フロー} + \text{第二緩衝液フロー} + \text{試料フロー}} \quad (12a)$$

$$\text{界面 2} = w \cdot \frac{\text{第二緩衝液フロー}}{\text{第一緩衝液フロー} + \text{第二緩衝液フロー} + \text{試料フロー}} \quad (12b)$$

ここで、 $w$ は、フローセルの幅である(但し、 $w \gg h$ )。

【0052】

界面(単数または複数)の位置のさらに正確な計算には、上記等式を速度分布

図用の式で補正する必要がある ( Brody *ら*, *Biophysical Journal* 71:3430~3441, 1996 )。この速度分布図は、このフローセルの壁に接近している場合、速度0であり、かつこのフローセルの中央では最大速度であると仮定している。中央フローを同じ流速の2本の隣接フローに向けることにより、この中央フローは、このフローセルの中心に位置する ( 図5Aで図示される )。しかし、もし、これらの2本の隣接フローの1本が、例えば、その全流速の5%の流速を有しているなら、このフローは、実際には、このフローセルの断面積の5%より大きい部分を占める。なぜなら、このフローセルの壁に近い線形流速は、その中央部の線形流速よりも遅いからである。同じ容量流速は、このフローセルの中央部よりも、フローセルの壁に近い部分がより広くなっていることを必要とする。

#### 【0053】

さらに、別個のフロー ( 例えば、緩衝液 ) を用いて、この試料フローをフローセル内に向けるには、この試料の拡散を、これらの2本のフローの間の界面に近い領域に限定する必要がある。そうでなければ、拡散は、この試料フローの方向性を妨害し、2本 ( またはそれより多い ) 別個のフローよりもむしろ、試料および緩衝液の「染み ( smear )」が生じる。拡散は、時間依存性プロセスであるため、試料および緩衝液の線形流速は、拡散をこの界面に近接した部分に制限するように選択されるべきである。フローセル内での拡散は、この界面に平行な濃度勾配が無視できるので、一次元現象として見える。フローセルの側壁での濃度が一定である限り、フローセルの幅は、無限であると仮定され得る。この界面での接触時間は、図6で示すように、このフローが、分子を、一定の線形流速で、このフローセルを通して移動するのにかかる時間と同じであり、ここで、 $t$  は、接触時間 ( 秒 ) であり、 $f$  は、全容量流速 (  $\text{m}^3 / \text{秒}$  ) であり、 $A$  は、このフローセルの断面積 (  $\text{m}^2$  ) であり、 $u$  は、線形流速 (  $\text{m} / \text{秒}$  ) であり、そして  $D$  は、拡散定数 (  $\text{m}^2 / \text{秒}$  ) である。従って、接触時間は、フローセルの長さ割るこの線形流速として表わされ得、平均拡散幅は、およそ  $\sqrt{Dt}$  である。図6の濃い領域は、初期試料濃度の100%に相当しており、灰色領域は、100~50%に相当しており、そして薄い灰色領域は、50~0%に相当している。

【0054】

この距離および時間の関数としての濃度に対する式は、フィックの第二法則から誘導され、これは、Yフローセルで遭遇する一次元拡散に対する等式(13)の解を有する：

【0055】

【数13】

$$c(x,t) = \frac{C_0}{2} \left( 1 + \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{\frac{x - \text{界面}}{2\sqrt{Dt}}} e^{-\beta^2} d\beta \right) \quad (13)$$

簡単に言えば、等式(13)は、距離および時間の関数としての濃度に対する式であり、ここで、x(距離)は、この界面から垂直に測定される(すなわち、xは、この界面では、0である)。同様に、ψフローセルに関連して、距離および時間の関数としての濃度に対する式は、等式(14)により示される：

【0056】

【数14】

$$c(x,t) = \frac{C_0}{2} \left( \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{\frac{x - \text{界面} 1}{2\sqrt{Dt}}} e^{-\beta^2} d\beta - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^{\frac{x - \text{界面} 2}{2\sqrt{Dt}}} e^{-\beta^2} d\beta \right) \quad (14)$$

図7Aおよび7Bは、それぞれ、異なる接触時間に対する等式(13)および(14)のグラフ表示であり、ここで、x軸は、上で述べたように、この界面からの距離xであり、そしてy軸は、その相対濃度である(0~100%の範囲)。

【0057】

前出の論述において、本発明の代表的なフローセルが開示されており、これは、特に、試料フローの位置および幅に関して、このフローセル内の層流を制御できる。このようなフローセルは、種々の用途を有する。1実施態様では、このフ

ローセルは、試料をこのフローセル内の感知領域と選択的に接触させるのに使用され得る。このようにして、複数の感知領域を有するフローセルが使用され得、この試料フローは、上で述べた技術により、これらの感知領域の1個またはそれ以上と選択的に接触される。例えば、上で述べた図4Aおよび4Bは、2個の感知領域を有するフローセルを図示しており、試料フローは、これらの感知領域の1個と選択的に接触される。しかしながら、複数の感知領域が利用され得ること、およびこの試料フローは、層流状態にて、これらの感知領域のいずれかと選択的に接触され得ることを認識すべきである。

#### 【0058】

別の局面では、この試料フローは、フローセル内の別個の感知領域を感作するのに使用されるリガンドを含有する。本明細書中で使用される「感作する」または（「感作」）とは、この感知領域が所望分析物と特異的に相互作用できる感知領域の任意のプロセスまたは活性化を意味する。得られた表面は、本明細書中では、「感作感知領域」または「感作領域」と呼ぶ。

#### 【0059】

本明細書中で使用する「リガンド」および「分析物」との用語は、広く解釈すべきであり、そして広範囲の相互作用を包含する。例えば、このフローセルの感知領域は、それへの分析物特異的リガンドの固定化により、感作され得る。このことに関連した代表的なリガンドには、以下が挙げられるが、これらに限定されない（以下のリストでは、代表的な結合パートナーは、括弧で示している）：抗原（特異的抗体）、抗体（抗原）、ホルモン（ホルモンレセプター）、ホルモンレセプター（ホルモン）、ポリヌクレオチド（相補的ポリヌクレオチド）、アビジン（ビオチン）、ビオチン（アビジン）、酵素（酵素基質またはインヒビター）、酵素基質またはインヒビター（酵素）、レクチン（特異的炭水化物）、特異的炭水化物（レクチン）、脂質（脂質結合タンパク質または膜会合タンパク質）、脂質結合タンパク質または膜会合タンパク質（脂質）、ポリヌクレオチド（ポリヌクレオチド結合タンパク質）、およびポリヌクレオチド結合タンパク質（ポリヌクレオチド）、ならびに、さらに一般的な型の相互作用（例えば、タンパク質（タンパク質）、タンパク質（ポリヌクレオチド）、ポリヌクレオチド（タン

バク質)、DNA(DNA)、DNA(RNA)およびRNA(DNA)相互作用、および小有機合成化合物とタンパク質または核酸との間の相互作用)。

#### 【0060】

適当なリガンドはまた、二官能性化合物を含めた種々の化学化合物(これらは、例えば、化学ライブラリを形成するのに、使用され得る)を含有する。当業者は、本発明のリガンド、およびこの試料フロー中に存在する、対応する分析物が、種々のタスク(これには、結合、ハイブリダイゼーション、組合せ化学、およびこの感知面上での他の複合体形成が挙げられるが、これらに限定されない)を実行するために感作表面領域を作成するのに使用され得る広範囲の分子を含有することを認識する。このような相互作用の全ては、分析物-リガンド相互作用の範囲内に含まれる。この用語は、本発明の関連して使用されるからである。さらに、このような相互作用には、共有結合力および非共有結合力(例えば、静電力、疎水性力、分散力、ファンデルワールス力または水素結合力、あるいはそれらのいずれかの組合せ)が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0061】

上で述べたように、このフローセル内でのこの試料フローの位置は、この試料フローの幅と同様に、本発明の実施する際に、制御され得る。これにより、このフローセル内にて、狭い列で、リガンドを固定化することが可能となる。例えば、このフローセル内では、この感知面上でのリガンドの固定化中にて、この感知面を過ぎる試料フローを選択的に指示することにより、勾配が作成できる。本発明のこの局面は、図8で図示されており、ここで、Yフローセル800は、感知領域820、830、840および850を含む。試料フロー(これは、矢印865により描写される)および緩衝液フロー(これは、矢印875により描写される)は、このフローセルに導入され、その中で、層流状態にて流れて、矢印885で表わすように、このフローセルから出ていく。最初は、試料フローは、感知領域820と接触するにすぎず、試料フロー865と緩衝液フロー875との間の界面825は、感知領域820と830との間に位置している。この試料フローおよび緩衝液フローは、次いで、この試料フローが感知領域830と接触するように調整され、界面835は、ここで、感知領域830と840との間に位

置している。これは、次いで、界面 845 を感知領域 840 と 850 との間に移動するように繰り返され、感知領域 850 は、コントロールとして供される。この試料が感知領域 820、830 および 840 を過ぎて流れる時間長さは、各感知領域の表面に結合された固定化リガンドの量に関して、勾配を生じる。図 8 の灰色の種々の陰影は、各感知領域上の結合リガンドの量を表すことが意図される、すなわち、薄い色に対する濃い色は、少ない量の結合リガンドに対する多い量の結合リガンドを表わしていることに注目すべきである。本発明のこの局面は、段階勾配として、図 8 で図示しているものの、同様に、連続勾配が生じ得る。

#### 【0062】

代替実施態様では、Y フローセルは、別個の感知領域を異なるリガンドで感作するのに使用され得る。図 9 で図示しているように、感知領域 910 および 911 は、第一リガンドを含有する第一試料フロー（これは、矢印 920 により描写されている）を、第二フロー（これは、矢印 930 により描写されている）と共に、層流状態にて、フローセル 900 に導入することにより、異なるリガンドで感作され得る。このようにして、感知領域 911 は、第一リガンドで感作される。第二フロー 930 は、1 実施態様では、緩衝液フローであり得、または別の実施態様では、第二リガンドを含有する第二試料フローであり得、この場合、感知領域 910 は、第一リガンドでの感知領域 911 の感作と同時に、第二リガンドで感作される。第二フローが緩衝液フローであるとき、この緩衝液フローは、引き続き、第二試料フローで置き換えられ得、この場合、感知領域 910 は、感知領域 911 が第一リガンドで感作されるのに引き続き、第二リガンドで感作される。この実施態様では、第一試料フローは、残るか、または第一緩衝液フローで置換され得る。

#### 【0063】

ψ フローセルに関連して、さらに、感作の浸透が可能である。例えば、2 個またはそれ以上の感知領域は、このリガンドを含有する試料フローをこのフローセル内に選択的に配置することにより、同じまたは異なるリガンドで感作され得る。それゆえ、1 実施態様では、3 個の感知領域が、図 10 で図示しているように、同じまたは異なるリガンドで感作され得る。図 10 を参照すると、第一リガン

ドを含有する試料フロー（これは、矢印1010により描写されており、そして例示の目的のために、陰影が付けられている）は、感知領域1820が第一リガンドで感作されるように、フローセル1000内にて、第一フローと第二フロー（これらは、それぞれ、矢印1011および1012により描写されている）との間に向けられる。感知領域1021および1022は、次いで、それが所望の感知領域を含むように、試料フロー1010をこのフローセル内に向けることにより、感作され得、それにより、それを、この試料フロー内に含有されるリガンドで感作する。このようにして、多数の感知領域が、このフローセル内にて、任意数の所望リガンドにより、感作され得る。

#### 【0064】

さらに別の実施態様では、第二試料フローは、このフローセル内にて、一定角度で（典型的には、第一試料フローと垂直に）、この感知面を過ぎて通過され得、それにより、重なり合った感知領域を作成させる。この実施態様は、一般に、本明細書中では、二次元または「2D」フローセルと呼ばれる。本発明の実施において、このような2Dフローセルを使用することにより、フローセル内にて、重なり合った感知領域の感作が可能となる。本発明の代表的な2Dフローセルは、図11Aで図示されている。この図は、2つのψフローセルの組合せ（「2Dψフローセル」）を表わしており、それらの試料フローは、互いに直角である。図11Aは、2Dψフローセルを描写しているものの、2DYフローセルは、同様に、使用でき、図11Aで描写した6個の入口（すなわち、3個の入口×2個のψフローセル）よりも多い入口を有する2Dψフローセル、または任意数の入口を有するYおよびψフローセルの任意の組合せも使用できることを理解すべきである。

#### 【0065】

図11Aを参照すると、フローセル1100は、緩衝液入口1122、1123、1126および1127、および試料入口1130および1132を有する。第一試料フロー（これは、矢印1131により描写されている）は、このフローセルを通過して、出口1150を経由して、出ていく。同様に、第二試料フロー（これは、矢印1133により描写されている）は、第一試料フローに対して



一定角度(この場合、直角)でこのフローセルを通過させることにより、連続的に適用でき、そして出口1152を経由して、出ていく。第一および第二試料フローの位置ならびに幅は、 $\Psi$ フローセルに関して上で開示した様式で、制御される。図11Bを参照すると、図11Aの側面図が提示されている。このフローセルは、中心水平域1140を有し、これは、第一および第二試料フローを、感知面1160と接触するように指示する。図11Bの場合、第一試料フロー1131が描写されている。

#### 【0066】

本発明のフローセルを使用することにより、多様な感作感知領域が作成され得る。例えば、図11Aの2D $\Psi$ フローセルは、図12で図示しているような感作マトリックスを作製するのに、使用され得る。図12Aは、第一リガンドを含有する試料フロー(これは、矢印1210により描写されている)を示し、これは、図12Bで示すように、感知面1220を横切って感作領域1222を生じるように指示される。第二リガンドを含有する第二試料フローは、図12Cの矢印1230により描写されているように、感知面1220を横切って指示されて、図12Dで表わされるように、感作領域1240を生じ、これは、感作領域1222と重なり合う。この重なり合い領域は、それゆえ、連続的に適用された2個の異なるリガンドで感作される。

#### 【0067】

このような感知面の選択的な感作により、多数の感作選択肢が可能となることが分かる。例えば、図12Cの第二試料フロー1230内に含有された第二リガンドが、感作領域1222の第一リガンドと相互作用する程度まで、得られる重なり合い領域1260は、図12Eのように描写され得る。簡単に言えば、この感知面上の別個の領域が、第一リガンドで感作され、続いて、第二リガンドで感作される。もし、第一リガンドが、例えば、この感知面上に固定された二官能性試薬であるなら、第二リガンドは、この固定化試薬と反応して、この感知面上にて、領域または「スポット」を生じ得、これは、第二リガンドをそこに結合しつつ、固定化二官能性試薬(すなわち、第一リガンド)で選択的に変性される。

#### 【0068】

同様に、図13Aで図示しているように、異なるフロー（これらは、矢印1310、1320および1330により描写されており、各々は、異なるリガンドを含有する）を指示することにより、図13Bで示すように、3個の異なる固定化リガンドの感作領域1311、1321および1331が感知面1350上に作成される。図13Cを参照すると、矢印1360、1370および1380により描写された3個の試料フロー（各々は、同じまたは異なるリガンドを含有する）は、感知面1350を横切って指示されて、感作領域1391、1392および1393を生じる。このようにして、図13Dの各重なり合った感作領域は、図12Dで描写された感作面と類似しており、そして図13Eで示したように、1378によって、感作領域1370として表わされ得る。

#### 【0069】

当業者は、このような二次元マトリックスが使用できる広範囲の用途を容易に理解する。基本的には、このフローセルの感知面上の別個の位置で捕捉され得る任意の相互作用が測定され得る。例えば、代表的な相互作用には、ハイブリダイゼーションによるDNA配列決定の相互作用があり、ここで、このマトリックスは、上で開示したような二次元での層流を用いた以下のカップリング手順により、作製され得る。まず、このセンサ面（例えば、そこにストレプトアビジンを結合したデキストラン被覆面）は、図13Bで図示しているように、規定のバンド1311、1321および1331にて、その上に固定したリガンド（例えば、ビオチン化DNAオリゴヌクレオチド）を有する。このようなバンドは、図13Aで図示しているように、試料フロー1310、1320および1330を感知面1350を過ぎて通過させることにより、発生され、各試料フローは、異なるビオチン化オリゴヌクレオチドを含有する。相補的DNAオリゴヌクレオチドは、次いで、図13Cで矢印1360、1370および1380で図示しているように、この感知面を横切って向けられ、図13Eで示すように、固定化相補的DNAオリゴヌクレオチドのパターンを生じ、ここで、各領域（1370～1378）は、異なる固定化相補的DNAを表わす。

#### 【0070】

この活性試薬を含有する液体フローは、このセンサ領域の全幅から非常に狭い

寸法まで、任意の幅に配置できる。これらの試薬を配置する液体流れでは、異なる液体および反応条件が適用できる。このような状況は、この第二次元試薬が導入される前に隣接ラインが形成されるとき、形成される活性中間体を保護するのに、使用できる。実際、本発明は、センサ面上の規定領域にて任意の種類の化学合成を実行するのに、使用され得る。有機溶媒は、試薬が水に溶解するのが困難である場合、使用され得る。また、例えば、有機液体との接触による分解からタンパク質を保護するために、このフローシステムでは、有機溶媒から水相への物質の拡散を使用することも可能である。さらに、化学ライブラリは、センサ面上での段階的な反応により、作成できる。複合体分子は、比較的に少数の分子構築ブロックを用いて、構築され得る。本発明はまた、センサ面上の規定領域にある重合体（例えば、ペプチドまたはオリゴヌクレオチド）を規定配列で構築するために、使用され得る。この活性化のためのさらに大きいまたは小さい領域だけでなく、これらの異なる次元で保護または脱保護を使用することにより、規定配列が構築できる。

#### 【0071】

本発明の別の用途は、いかにして複数の生体分子複合体が形成されるか、およびそれらがどのように機能するかを研究するためにある。一例は、互いに関して、一連の抗体に対する結合部位を発見するための抗原のエピトープマッピングがある。反応領域の二次元構築用に記述した手順により、エピトープマッピングが、それにより、実行され得る。これは、例えば、SPR検出のような技術、または最後の分子を蛍光により導入した後の結合物質の分析により、複合体形成のための相互作用を直接測定することによって、行うことができる。例示的な手順は、以下のものである：RAMFc抗体で覆った表面にて、培養液に直接由来の全ての分析した抗体に対して、異なるラインを一方向で形成する；無関係の抗体による相互作用で抗体をブロックすることにより、その全面を覆う；この全面を、固定化一次モノクローナル抗体で全てのラインに吸収される抗原で覆う；第二次元で、同じ抗体を導入し、そして各領域に対する第二相互作用について形成した複合体を測定する；そしてこの全面の再生を実行する。類似の型の別の状況には、一連のタンパク質（例えば）活性複合体を形成するときがあり、吸収する物質

の順序は、重要である。物質導入の異なる組合せが導入でき、得られる反応パターンが観察される。

#### 【0072】

本発明のさらなる局面では、その上に1個または複数の感作感知領域を有する感知面が開示されている。このような感知面は、広範囲の用途に使用され得る。例えば、このような面は、各感作領域にて、異なるリガンドで感作され得る。次いで、試料は、この感知面上の感作領域の位置、測定した任意の一定のリガンドと試料との間の相互作用に基づいて、全ての感作領域と接触され得る。この実施態様において、この感知面と試料との接触は、その全表面が試料と接触され得るので、フローセル内で起こる必要はない。あるいは、もし、この感知面と試料との選択的な接触が望ましいなら、このような接触は、本発明のフローセル内で起こり得る。

#### 【0073】

本発明の別の局面では、試料フローは、層流法により、1個またはそれ以上の別個の感知領域を有する感知面を過ぎて向けられる。リガンドを含有する試料フローを用いた感作に関して上で述べたように、(リガンドに対して)分析物を含有する試料フローは、本発明の層流法により、感作面(これは、本発明の層流法または他の技術により、感作できる)を横切って向けられ得、それにより、この感知領域上でのリガンドとの相互作用が可能となる。本明細書中で記述した層流法は、極めて速い上昇および下降時間を達成し、これにより、標準的な結合分析に加えて、速い反応速度を測定するのが可能となる。

#### 【0074】

この点では、本発明の1実施態様にて、この界面の移動が使用されて、分析物を含有する試料フローを感知領域と接触させ得る。これは、図3Aを参照して図示され得る。この図を参照すると、Yフローセル300は、感作感知領域320を有し、そして試料フロー(矢印350により描写された陰影流体)および緩衝液フロー(矢印340により描写される)は、境界380が、この試料フローがこの感作感知領域と接触しないように、このフローセル内の適当な位置にあるように調整される。この試料および緩衝液の流速は、次いで、図3Bで示すように

、この界面を位置381に移動するように調整され、それにより、試料フロー350を感作感知領域320と接触させる。この実施態様では、この上昇および下降時間は、上でさらに詳細に述べたように、この界面の、第一位置（この位置では、この感知領域と接触しない）（図3Aを参照）から第二位置（この位置では、この試料フローは、この感知領域と接触される）（図3Bを参照）への移動によつてのみ、限定される。この界面を第一位置から第二位置へと移動するのに必要な試料の容量は、このフローセルそれ自体の容量の一部である。それゆえ、この感知領域からある距離で弁を用いて緩衝液フローから試料フローへとシフトする代わりに（例えば、BIAcore器具に対して、約0.5 $\mu$ lの容量）、この界面は、このフローセルの容量の僅かに一部分（例えば、0.05 $\mu$ l）を用いて、移動できる。この上昇時間は、追い出される（displace）容量に比例しているので、10分の1の容量低下により、この上昇時間は、約10分の1に短くなる。同様の利点は、より短い下降時間で達成される。

#### 【0075】

このような速い上昇および下降時間は、速い反応速度を測定するとき、必要である。例えば、本発明の技術は、会合および解離を研究するのに使用され得る。1実施態様では、分析物は、感作感知領域に通され得る。この試料フローは、次いで、この感作感知領域との接触から追い出され得、その解離速度が検出できる。あるいは、試料フローは、感作感知領域へと急速に追い出され得、それにより、会合速度の検出および分析が可能となる。

#### 【0076】

本発明の別の実施態様では、分析の目的のために、単一のフローセル内にて、複数の感知領域が使用され得る。1局面では、このフローセルは、2個の感知領域を含み得る。図4Aで図示されているように、フローセル400は、試料フロー（矢印455により描写される陰影を付けた流体）、緩衝液（これは、矢印465により描写されている）および界面470と共に、感知領域420および430を有し、この試料フローが感知領域420または430のいずれにも接触しないようにされる。この緩衝液および試料の流速は、次いで、界面470を、界面471として図4Bで描写したような感知領域420および430の間の位置

へと移動することにより、試料フロー455が感知領域430と接触するように調整される。この界面をこのように移動することの利点は、上で述べたとおりである。さらに、これらの複数の感知領域は、同じフローセル内にて、近接して位置しているので、これらの2個の感知領域の間の時間のずれおよび温度変化は、無視でき、これにより、試料分析の信頼性および精度が高まる。

#### 【0077】

さらに、このフローセル内の試料フローの位置を制御する性能を、複数の感知領域と組み合わせることにより、広範囲の用途が可能となる。例えば、依然として、図4Aおよび4Bを参照すると、感知領域420は、非感作または感作感知領域であり得る。それゆえ、図4Aおよび4Bの感知領域420は、非感作またはブランクコントロール（すなわち、表面固定化リガンドがない）あるいは感作コントロール（すなわち、そこに固定化リガンドが結合された）として、使用され得る。ブランクコントロールは、この感知領域（例えば、デキストランマトリックス）への非特異的結合を検出できるのに対して、感作コントロールは、マトリックスおよび固定化リガンドの両方に対する非特異的結合についての情報を提供する。このようにして、バルク効果および非特異的結合は、「差し引く（subtracted out）」ことができる。このような差し引きは、このリガンドの固定化レベルが、この感作感知領域および感作コントロールについて同じであるとき、最もよく達成される。これは、高い固定化レベルを使用するとき（例えば、この分析物が小さい分子であるとき）、特に重要である。本発明のこの局面は、実施例5でさらに例示する。

#### 【0078】

本発明の別の実施態様では、種々の方法にて、複数の感知領域が使用され得る。例えば、図14Aおよび14Bで図示されているように、フローセル1400は、感作感知領域1440および1460、ならびに非感作感知領域1450上に固定化されたリガンドを有し得る。このリガンド固定化は、このリガンドを含有する試料フローをこの感知面を過ぎて向けるために、上記技術を用いて達成され得る。しかしながら、当業者は、この感知領域の感作が、分析物を含有する試料フローを用いた精査の前に、本明細書中で開示した層流法以外の方法により、

達成され得ることを認識する。例えば、別個の感作感知領域は、現在公知の技術（例えば、マスキングを用いた表面変性法（例えば、フォトリソグラフィー））により、作製され得る。分析物を含有する試料フローは、次いで、この試料フローが感知領域1440、1450および1460と接触するように、矢印1430で表わされるように、このフローセルへと向けられ得る。このようにして、非感作感知領域1450は、コントロールとして役立ち、そして感作感知領域1440および1460は、それに付随した同一または異なるリガンドを有し得る。この技術は、複数の分析物を含有する流体の分析（例えば、体液の分析）で、特に有利であり、これらの分析物は、この技術を用いて、同時に分析できる。

#### 【0079】

あるいは、図14Bで図示しているように、フローセル1400は、感作感知領域1450および1460上で固定されたりガンドを有し得、感知領域1440は、非感作コントロールとして役立つ。分析物を含有する試料フロー（これは、矢印1432により描写され、また、例示の目的のために、陰影が付けられている）および緩衝液フロー（これは、矢印1434により描写されている）の両方は、この試料および緩衝液フローの界面1465が感知領域1460および1450の間になるように、このフローセルへと向けられ得る。このようにして、感作感知領域1450は、主要分析物領域として役立つ、感知領域1440および1460は、共に、コントロール（すなわち、感知領域1440 - 試料フロー、固定化リガンドなし；感知領域1460 - 緩衝液フロー、固定化リガンドを備えた）として役立つ。この実施態様では、この分析物を含有する試料フローの、複数別個の感知領域への移動が達成できる。従って、試料フロー内に含有された分析物の独立した分析は、単に、この試料フローを対象感知領域上に移動させることにより、ほぼ同時に行われ得る。これはまた、複数の緩衝液および試料フローを用いて、達成できる。

#### 【0080】

上記技術はまた、このフローセルでのイオン交換の検出を可能にする（実施例3を参照）。さらに特定すると、この界面での拡散は、膜なし透析に使用できる（例えば、小分子は、大分子よりも速く、この界面を横切って拡散する）。この

試料フローとしてクロマトグラフィー溶出液（例えば、インラインまたは試料画分）を使用することにより、その塩含量（例えば、イオン交換クロマトグラフィー）または有機溶媒含量（例えば、逆相クロマトグラフィー）が変わる。この変化により、このフローセルでの注入またはインサイチュ透析による直接検出が可能となり、それにより、この試料の希釈または前透析が回避できる。

#### 【0081】

さらなる実施態様では、水相に溶解するのが困難な分析物は、有機試料フローにて、このフローセルに通され、隣接水流へと拡散され、次いで、上で述べた技術の1個またはそれ以上で使用され得る。

#### 【0082】

以下の実施例は、限定ではなく、例示の目的で提供されている。

#### 【0083】

（実施例）

（実施例1）

代表的なフローセル

本実施例は、代表的なフローセル、ならびに本発明に関連したその使用を開示している。特に、異なるYおよびψフローセルを説明する。

#### 【0084】

代表的なYフローセルは、BIAcore1000システム（BIAcore AB、Uppsala、Sweden）用の市販IFC4のフローチャンネル1および2への入口ならびにフローチャンネル2への出口を使用する。図15を参照すると、試料フローは、入口1510からYフローセル1500へと入り、また、緩衝液は、入口1520から、このYフローセルに入る。試料および緩衝液の両方は、出口1530を経由して、このYフローセルを出ていく。試料および緩衝液の両方は、IFC4の追加チャンネルを切断することにより、このフローセルへと向けられ、試料および緩衝液の両方が、このフローセルを同時に流れることができるようになる。このYフローセルの容量は、180nl（すなわち、市販のBIAcoreフローセルの容量の3倍）である。

#### 【0085】



代表的な一次元(「1D」)ψフローセルは、図16で描写されており、ここで、試料フローは、入口1610を経由して、ψフローセル1600に入り、緩衝液フローは、入口1670および1630を通して入り、そして全てのフローは、出口1640を出ていく。このψフローセルは、PMMAで製造されており、そしてこのフローセルに流体フローを送達するための500μlのHamilton注射器を備えたPharmacia 500ポンプを使用する。

#### 【0086】

##### (実施例2)

##### 流体フローの拡散

本実施例は、流体フローが実施例1の代表的なψフローセルを通るにつれて、それらの拡散に向けられた実験を要約する。図6に関連して上で言及したように、流体フローを層流状態にてフローセル内に向けるには、この試料の拡散を、これらのフロー間の界面に近い領域に限定する必要がある。もし、そうしないと、拡散は、この試料フローの方向性に緩衝して、別個のフローよりもむしろ、フローの「染み(smear)」が生じる。

#### 【0087】

本実験では、拡散幅は、約0.3秒後に測定されるが、これは、10μl/分の流速で、このBlacore器具のフローセルを通して分子を運搬するのにかかる時間である。この拡散幅(図17Aを参照)は、指示薬の色変化の幅(これは、Panasonic WV-KS152ビデオカメラおよび作業プロセッサに取り付けたマイクログラフを用いて、視覚検査で測定される)として、測定される。この界面での異なる接触時間に対する拡散幅は、 $(Dt \cdot C)^{1/2}$ で適合し、ここで、Cは、各pHに対して適合した無次元定数である(図17Bを参照)。この実験的拡散幅は、次いで、適合した定数Cからの異なる接触時間について、概算した。

#### 【0088】

表1は、プロトンの拡散について、実験結果および理論的に計算した値を示す。これらの理論値は、等式(14)を用いて計算される。色シフトを得るのに必要なpH変化は、pHメーターおよび視覚検査で測定した。これらの実験では、

必要なpH変化は、フェノールレッド（PR）に対して0.4pH単位であり、また、プロモフェノールブルー（BB）に対して0.6pH単位であった。100ml容器での色変化として知覚される濃度変化は、薄層フローセルについて、同じであり得ないので、BBに対する理論的拡散幅は、3種の異なる濃度変化（すなわち、pHシフト）について計算される。表1での「指示薬の拡散」の欄は、この酸流体への指示薬の拡散によるこの色変化バンドの広幅化を記述している。表1のPRおよびBB部分の誤差は、これらの2種の流体間のpH差が小さくなるにつれて、増加する傾向を示している。この挙動は、これらの2種の流体間の濃度差が小さくなるにつれて、その濃度勾配が平坦化するためであると考えられる。急な濃度勾配は、鋭い色変化を作り出すのに対して、平坦な濃度勾配は、拡散色変化を作る。結果的に、色シフトに対して必要なpH変化の不正確な概算により、これらの2種の流体間の濃度差が小さくなるにつれて、誤差が大きくなる。

【0089】

【表1】

表1  
フェノールレッドおよびプロモフェノールブルー指示薬へのプロトンの拡散

フェノールレッド 2.8 mM (pKa=7.9, D=3.4*10 <sup>-10</sup> )								
実験			理論的				誤差	
HCL pH	C	実験的な幅 (μm)	pH 変化	濃度変化 (%)	理論的な幅 (μm)	指示薬の拡散 (μm)	絶対	相対
0,086	4,6	249	0,4	22,5	243	16	-10	-0,04
1,08	3,5	189	0,4	22,5	187	16	-14	-0,07
1,9	2,9	157	0,4	22,5	127	16	14	0,09
1,04 (20% Glycerol)	2,8	157	0,4	22,5	144	12	1	0,01
1,04 (40% Glycerol)	2,2	123	0,4	22,5	100	8	15	0,12

プロモフェノールブルー 1.4 mM (pKa=4.1, D=2.71*10 <sup>-10</sup> )								
実験			理論的				誤差	
HCL pH	C	実験的な幅 (μm)	pH 変化	濃度変化 (%)	理論的な幅 (μm)	指示薬の拡散 (μm)	絶対	相対
0,086	4,4	247	2	82	231	14	2	0,01
			1	50	242	14	-9	-0,04
			0,6	33	257	14	-24	-0,10
1,08	3,4	191	2	82	171	14	6	0,03
			1	50	186	14	-9	-0,05
			0,6	33	199	14	-22	-0,12
1,9	2	112	2	82	105	14	-7	-0,06
			1	50	126	14	-28	-0,25
			0,6	33	144	14	-46	-0,41

上記表1では、Cは、この実験的に測定した拡散幅に  $(D \cdot t \cdot C)^{1/2}$  を適合することから得た定数であり、「実験的な幅」とは、0.3秒（これは、10μl / 分の流速で、BIAcore™フローセルを通過して、分子を運搬するのにかかる時間に相当している）の時間で、この実験データから得た指示薬流体へのプロトンの拡散幅であり、その理論的部分での「pH変化」は、この指示薬流体の視覚検査中に必要なpH変化である。このBB部分では、その理論的拡散幅は、BBの色変化を推定することが困難であるので、3つの異なるpH変化について計算される。「濃度変化」欄は、概算したpH変化に対応する濃度変化（すなわち、色変化が見える前に、いくつかの指示試薬分子がタンパク質分解されなければならない）であり、また、「理論幅」は、この指示薬の色変化に対して、必要な濃度変化から計算した理論的な拡散幅である。この酸流体へのこの指示薬の拡散は、「指示薬拡散」の欄で計算される。

PRに対するpHは、PRのpKaより低い1.0pH単位に調整したのに対して、BBに対するpHは、そのpKaより低い0.1pH単位に調整した。従って、色変化に必要な濃度変化は、PRよりもBBに対して、大きくなる。指示薬に対するpHを調整する際の差は、BBに対する青色、青色-緑色-黄色および黄色の間で識別するのが困難なことから生じる。BBの色変化に対して、0.6pH単位が充分であるとの推定は、正確ではあり得ず、さらに、必要な濃度変化が1pH単位と2pH単位との間であった可能性がよりある。表1の結果から、誘導した理論値は、この薄層フローセルでの拡散を予測するのに使用され得ることが明らかである。さらに、フェノールレッドを用いた試験から、グリセロールのようなより粘稠な媒体中での拡散を所望の精度で計算することが可能であることが明らかとなる。

#### 【0091】

この目的を達するために、図18は、ある種の小分子だけでなく、異なるサイズのある種のタンパク質に対して計算した拡散幅を示すのに対して、表2は、計算した拡散幅の数値を示す。さらに、表2は、このフローセル内の感知面上にて、固定化分子の狭いバンドがいくつ配置され得るかを計算するのに必要な情報を提供する。例えば、1gGを見ると、100μl/分の流速および0.1%の分離では、この界面と0.1%との間の拡散幅は、5μmであり、そしてこの界面と99.9%との間の拡散幅もまた、5μmである。もし、この初期濃度の99.9%が、10μmの幅のバンドでの検出に必要ななら、その分離幅は、30μmである(図19を参照)。500μmの幅を有するフローセルでの30μmの狭いバンドにより、このフローセルでは、16個の可能なバンドが得られる。スクロースに対する同じ計算では、このフローセルにて、10個のバンドが得られる。しかしながら、バンド数は、短い感知領域を使用することにより、増やすことができ、その結果、この拡散幅が低下し、それゆえ、このフローセル内での可能なバンドの数が増えることに注目すべきである。

#### 【0092】

#### 【表2】

表2  
ある種のタンパク質および小分子に対する拡散幅 ( $\mu\text{m}$ )

タンパク質 / 分子	Mw	D ( $[\text{m}^2/\text{s}]$ )	フロー 10 ( $\mu\text{l}/\text{分}$ )			フロー 100 ( $\mu\text{l}/\text{分}$ )		
			0.1%	1%	10%	0.1%	1%	10%
ウレアーゼ	490,000	3,40E-11	14	11	6	5	3	2
免疫グロブリン (IgG)	156,000	4,00E-11	15	12	6	5	4	2
血清アルブミン	64,000	6,15E-11	19	15	8	6	5	3
ウシインシュリン	12,000	1,50E-10	30	23	13	10	7	4
スクロース	337	5,20E-10	56	42	24	18	13	8
Na <sup>+</sup>	11	1,33E-09	90	68	38	28	21	12
H <sup>+</sup>	1	9,31E-09	240	180	100	75	57	31

( 実施例 3 )

イオン交換 / オンライン透析

図20は、本発明の技術を使用して、いかにして、イオン交換またはオンライン透析が実行され得るかを示している。図20Aおよび20Bは、その隣接緩衝液における低イオン濃度でのイオン交換を図示している。図20Cおよび20Dは、その隣接緩衝液のイオン濃度が高いときのイオン交換を示している。図20で示したパネルは、2つの異なる流速についてのものである：図20Aおよび20Cでは、 $10\mu\text{l}/\text{分}$ であり、そして図20Bおよび20Dでは、 $100\mu\text{l}/\text{分}$ 。これらの界面間の距離は、図20A、20B、20Cおよび20Dにて、 $12\mu\text{m}$ である。図20Aを参照すると、その流速は、 $10\mu\text{l}/\text{分}$ であり、その隣接緩衝液に対する塩およびプロトンの濃度は、低い。この試料フロー中の塩濃度は、その初期濃度の10%まで低下し、そのプロトン濃度は、6%まで低下する。図20Bでは、その流速は、 $100\mu\text{l}/\text{分}$ であり、この試料フロー中の塩濃度は、その初期濃度のおよそ30%まで低下し、また、そのプロトン濃度は、この試料中の初期濃度のおよそ20%まで低下する。図20Cおよび20Dでは、その隣接緩衝液は、高い濃度の塩およびプロトンを有する。

【0093】

( 実施例 4 )

代表的なフローセルの交換速度

実施例1の代表的なYフローセル ( 図15を参照 ) での液体交換速度を測定するのに、スクロース溶液 ( 5重量% ) を使用し、市販のBIAcore2000

(これは、「IFC3フローセル」と呼ばれる)および市販のBIAcore 1000(これは、「IFC4フローセル」と呼ばれる)のフローセルと比較した。IFC3およびIFC4フローセルは、共に、60nlの容積であるが、これらのフローセルに至るチャンネルに関して、また、その弁の配置に関して、異なっている。本実験では、IFC3およびIFC4フローセルとの言及には、そのチャンネル、弁および60nlフローセルを含める。

#### 【0094】

その上昇時間は、試験したフローセルを通る異なる流速に対する水平域値の99%に到達するのにかかる時間として、測定した。この流速に対するこの上昇時間をプロットすること、およびこの曲線を等式(9)と適合させることにより、定数 $V_a$ が得られる。この定数を用いて、異なる流速に対する液体交換速度およびこのフローセルに対する液体交換速度定数の両方を計算することが可能である。

#### 【0095】

このYフローセルでの上昇中の速い液体交換は、以下のようにして、達成した。この試料をこのフローセルに導入する前に、このフローセルには、緩衝液だけを流した。この試料フローの弁をシフトし、この試料をこのフローセルに入れた。この試料フローは、このフローセルの狭い部分だけを満たした。この液体交換では、この緩衝液フローに対する弁を閉じ、この緩衝液をこの試料フローで置き換えて、このフローセルを満たした。その下降は、この上昇と同じようにして、行った。この緩衝液をこのフローセルに入れ、そしてこのフローセルの狭い部分だけを満たした。この試料フローの弁を閉じ、そして同じ流体をこの緩衝液フローで置き換えた。この感知領域を覆うのにかった時間は、この感知領域上でのその界面の移動、およびこの界面の分散に対応している。このことに関連して、この感知領域は、およそ1.6mm×0.17mmの面積であり、これは、図15の入口2と出口2との間に位置される(その全感知面は、大体、2.4mm×0.8mmである)。

#### 【0096】

図21Aおよび21Bは、Y、IFC3およびIFC4フローセルに対するセ

ンサグラムを比較する。その上昇時間と流速との間の実験的關係を得るために、その定常状態濃度の99%までの上昇時間を測定し、そして等式(9)に従って、この試料フローに対してプロットした(図21Cを参照のこと)。

#### 【0097】

等式(10)は、異なる流速に対する液体交換定数を計算するのに使用した。その反応速度の有効概算値を得るためには、 $K_{Lqx}$ は、そのオン速度およびオフ速度よりもずっと大きい。 $K_{Lqx}$ が大きくなるほど、速度はより速く測定され得る。この計算の結果は、図22で提示するが、これは、異なる流速での異なるフローセルに対する液体交換速度の比較を示す。

#### 【0098】

BIAcore IFC3およびIFC4フローセルでは、その界面は、その感知領域の長さにならってリンスされ、その検出領域の長さは、その幅の10倍である。このYフローセルでは、その界面は、このフローセルの幅と平行な方向で(すなわち、その側面に対して横に)、その感知面を過ぎてずらされる。それゆえ、この界面が移動しなければならない距離は、IFC3またはIFC4フローセルの10分の1未満である。そのフロー方向に対して横のこの移動は、このYフローセルでの小さな分散と組み合わせて、何故、その流体交換が、このYフローセルではずっと速く行われ得るかを説明している。

#### 【0099】

このYフローセルの上昇中において、その下降よりもさらに速い液体交換(図22を参照)は、このフローセルでの全フローに対して、この上昇前では、この下降中よりも、必要な試料フローが低いという事実に基づいている。この感知領域を覆うためには、このYフローセルに対する下降前でのさらに大きなフローが必要である(すなわち、この界面は、この試料フロー入口からさらに遠くに離れている)。IFC3およびIFC4フローセルでの緩衝液フロー弁は、その試料フロー弁よりも、このフローセルの近くに配置されている(すなわち、IFC3および4フローセルでの分散は、試料フローに対する液体交換よりも、緩衝液フローに対する液体交換の方が少ない)。これらの2つの効果は、共に、この下降と比較して、この上昇の改善を説明している。

## 【0100】

## (実施例5)

## 感知および分析

本実験は、別個の感知領域上で2個の異なるリガンドを固定化するための本発明の代表的なYフローセルの使用を説明する。固定化は、層流状態にて、並行して、このフローセルを通る2本の流体フローを用いて、行った。図15のYフローセルを用いて、本実験にて、BioCore2000を使用した。図23Aは、感知領域1上での第一リガンド(すなわち、「R1」と呼ばれるビオチン化オリゴヌクレオチド15マー(15-mer))の固定化の結果、およびこの固定化中でのこのYフローセルの概要を示す。この固定化中にて、感知領域2および3からの応答は存在しなかった。そのセンサグラムから、この固定化フローによる(感知領域2および3上の緩衝液フローからではなく)バルク効果が明らかになる。感知領域3上での第二リガンド(すなわち、「R2」と呼ばれる異なるビオチン化オリゴヌクレオチド15マー)の固定化中には、図23Bで示すように、感知領域1および2からの応答は存在しなかった。これらのセンサグラムは、明らかに、このYフローセルが、単一フローセルでの2種の異なるリガンドの固定化に対して、非常に良好であることを示している。

## 【0101】

図23Cは、分析物(すなわち、「R4」と呼ばれるオリゴ16マーであって、これは、R1と相補的である)の注入を示す。その全感知面を、この分析物と接触した。この分析物は、たとえ、これらの感作領域(すなわち、感知領域1および3)の両方と接触しても、感知領域1との特異的相互作用だけが、応答を与えた。その非相互作用リガンドおよび非感作領域は、参照として使用できる。図23Cは、全ての感知領域からのバルク効果を示すが、このバルク効果は、図23Eでは、差し引かれている。図23Dは、異なる分析物(「R5」と呼ばれるオリゴ16マーであって、これは、R2と相補的である)の注入を示す。そのバルク効果は、大体、100RUであるが、このバルク効果は、図23Fで示すように、差し引かれ得る。

## 【0102】



前述のことから、本明細書中では、例示の目的のために、本発明の特定の実施態様が論述されているものの、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、種々の改変がなされ得ることが明らかである。

【図面の簡単な説明】

【図1A】

図1A（従来技術）は、上から見たIFCのチャンネルおよび弁を描写し、その差込図は、このIFCにセンサチップを押し付けることにより、いかにして、これらのフローセルが形成されるかの側面図を示す（白丸および黒丸は、それぞれ、開いた弁および閉じた弁を表わす）。

【図1B】

図1B（従来技術）は、4個のフローセルのうちの3個を通る試料フローを図示している（白丸および黒丸は、それぞれ、開いた弁および閉じた弁を表わす）。

。

【図2A】

図2Aは、2本の層流を備えたYフローセルを図示している（1本は、緩衝液フローであり、そして1本は、試料フローである）。

【図2B】

図2Bは、2本の層流を備えたYフローセルを図示している（1本は、緩衝液フローであり、そして1本は、試料フローである）。

【図3A】

図3Aは、感知領域に隣接して配置された試料界面を図示している。

【図3B】

図3Bは、感知領域を覆う試料流体を示す。

【図4A】

図4Aは、両方の感知領域に最初に隣接した試料フローを備えた2個の感知領域を有するYフローセルを図示している。

【図4B】

図4Bは、試料フローが感知領域の1個に接触するように移動された界面を示す。

**【図5A】**

図5Aは、2個の緩衝液フロー入口および1個の試料フロー入口を有する代表的な $\Psi$ フローセルを図示している。

**【図5B】**

図5Bは、2個の緩衝液フロー入口および1個の試料フロー入口を有する代表的な $\Psi$ フローセルを図示している。

**【図6】**

図6は、接触時間 $t$ にわたる $Y$ フローセルでの拡散を表わし、ここで、 $f$ は、流速であり、 $L$ は、フローセルの長さであり、そして $A$ は、フローセルの断面積である。

**【図7A】**

図7Aは、この $Y$ フローセルの断面での異なる接触時間における試料濃度を描写している。

**【図7B】**

図7Bは、 $\Psi$ フローセルの断面での異なる接触時間における試料濃度を示す。

**【図8】**

図8は、感知面の感作中に試料および緩衝液の流速を変えることによる $Y$ フローセル中での勾配の形成を図示している。

**【図9】**

図9は、2個の別個の感知領域を有する $Y$ フローセルを図示している。

**【図10】**

図10は、3個の別個の感知領域を有する $\Psi$ フローセルを図示している。

**【図11A】**

図11Aは、代表的な二次元(2D) $\Psi$ フローセルを図示している。

**【図11B】**

図11Bは、代表的な二次元(2D) $\Psi$ フローセルを図示しており、その断面を描写している。

**【図12A】**

図12Aは、感知面上の感作列、および重なり合った感知領域の発生を図示し

ている。

【図12B】

図12Bは、感知面上の感作列、および重なり合った感知領域の発生を図示している。

【図12C】

図12Cは、感知面上の感作列、および重なり合った感知領域の発生を図示している。

【図12D】

図12Dは、感知面上の感作列、および重なり合った感知領域の発生を図示している。

【図12E】

図12Eは、感知面上の感作列、および重なり合った感知領域の発生を図示している。

【図13A】

図13Aは、本発明の感作マトリックスの発生を図示している。

【図13B】

図13Bは、本発明の感作マトリックスの発生を図示している。

【図13C】

図13Cは、本発明の感作マトリックスの発生を図示している。

【図13D】

図13Dは、本発明の感作マトリックスの発生を図示している。

【図13E】

図13Eは、本発明の感作マトリックスの発生を図示している。

【図14A】

図14Aは、2個の感作領域および1個の非感作領域を有するフローセルを図示しており、試料流れは、3個の領域の全てに接触する。

【図14B】

図14Bは、2個の感作領域および1個の非感作領域を有する代替実施態様を図示しており、試料流れは、1個の感作領域およびこの非感作領域と接触してい

る。

【図15】

図15は、代表的なYフローセルを描写している。

【図16】

図16は、代表的な一次元(1D)ψフローセルを図示している。

【図17A】

図17Aは、1Dψフローセルの拡散幅を図示しており、これは、異なる流速(すなわち、異なる接触時間)に対して、入口から2mm~10mmで測定される。

【図17B】

図17Bは、接触時間に対する拡散幅をグラフで表わしている。

【図18】

図18は、異なる流速および異なる濃度限界での異なるタンパク質および分子の拡散幅をグラフで表わしている。

【図19】

図19は、ψセルの概略断面図であり、その相対試料濃度は、y軸にあり、そして長さは、x軸にあり、そのフロー方向に対して直角である(その配置幅は、その試料濃度が>99.9%である場合の幅であり、その分離幅は、この試料濃度が<0.1%である場合の幅である)。

【図20A】

図20Aは、透析用のψフローセルの使用を図示している。

【図20B】

図20Bは、透析用のψフローセルの使用を図示している。

【図20C】

図20Cは、透析用のψフローセルの使用を図示している。

【図20D】

図20Dは、透析用のψフローセルの使用を図示している。

【図21A】

図21Aは、異なるフローセルに対して、それぞれ、その上昇および下降時間

を示すセンサグラムの一部を表わす。

【図 2 1 B】

図 2 1 B は、異なるフローセルに対して、それぞれ、その上昇および下降時間を示すセンサグラムの一部を表わす。

【図 2 1 C】

図 2 1 C は、試料フローに対する上昇時間のプロットを示す。

【図 2 2】

図 2 2 は、代表的な Y、I F C 3 および I F C 4 フローセルに対する液体交換速度定数の比較を提示する。

【図 2 3 A】

図 2 3 A は、2 個の別個の感知領域での感作、およびこのような別個の感知領域に特異的な分析物の選択的分析を図示している。

【図 2 3 B】

図 2 3 B は、2 個の別個の感知領域での感作、およびこのような別個の感知領域に特異的な分析物の選択的分析を図示している。

【図 2 3 C】

図 2 3 C は、2 個の別個の感知領域での感作、およびこのような別個の感知領域に特異的な分析物の選択的分析を図示している。

【図 2 3 D】

図 2 3 D は、2 個の別個の感知領域での感作、およびこのような別個の感知領域に特異的な分析物の選択的分析を図示している。

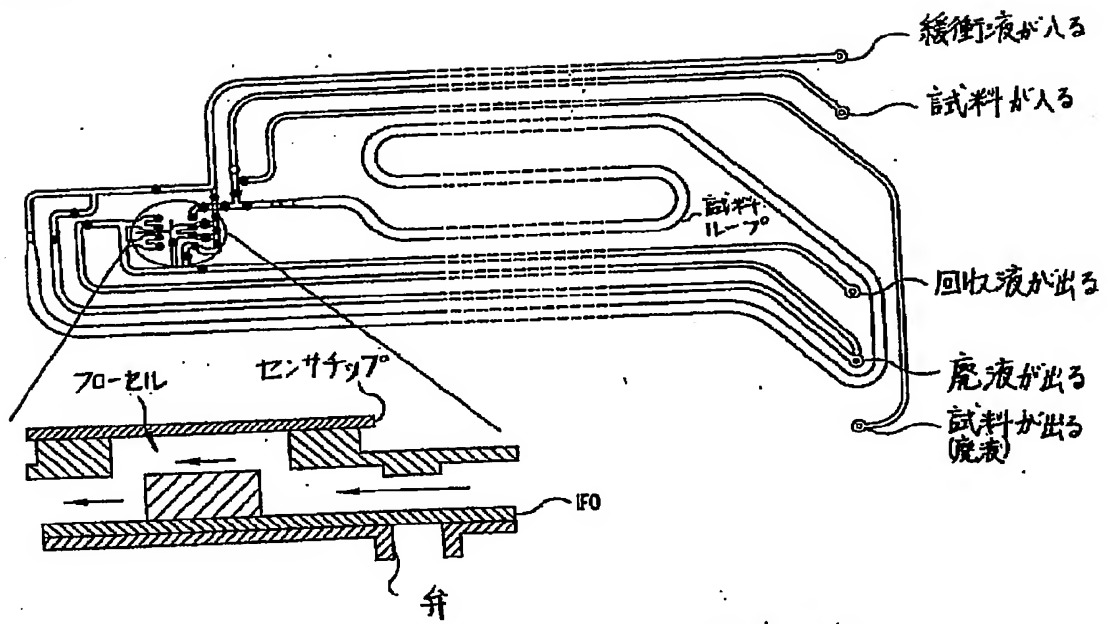
【図 2 3 E】

図 2 3 E は、2 個の別個の感知領域での感作、およびこのような別個の感知領域に特異的な分析物の選択的分析を図示している。

【図 2 3 F】

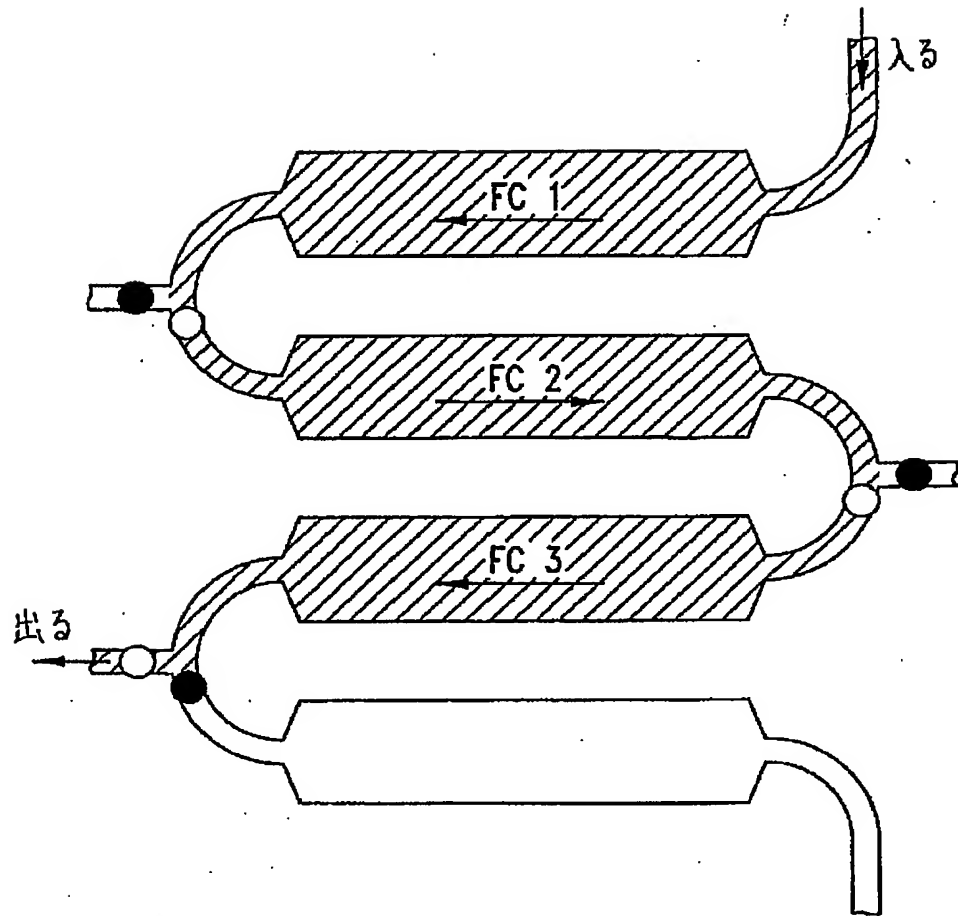
図 2 3 F は、2 個の別個の感知領域での感作、およびこのような別個の感知領域に特異的な分析物の選択的分析を図示している。

【図1A】



(従来技術)

【図1B】



(従来技術)

【図2A】

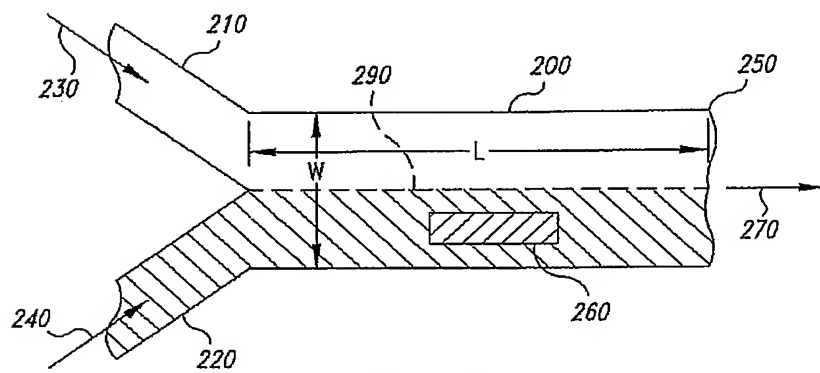
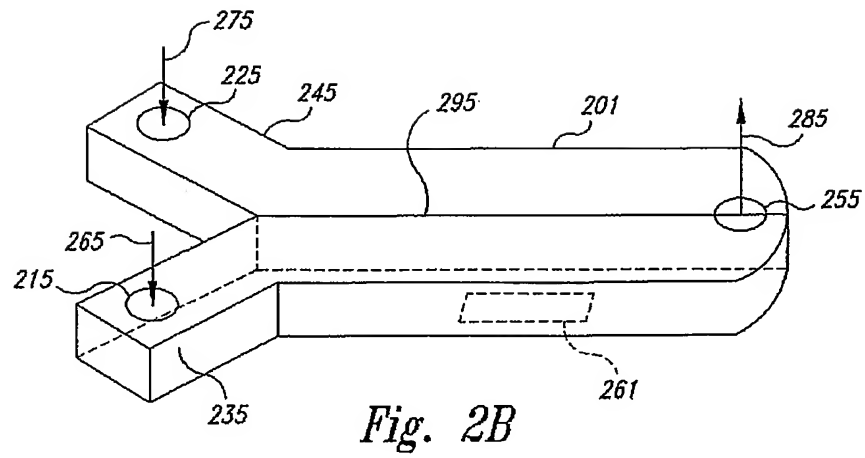
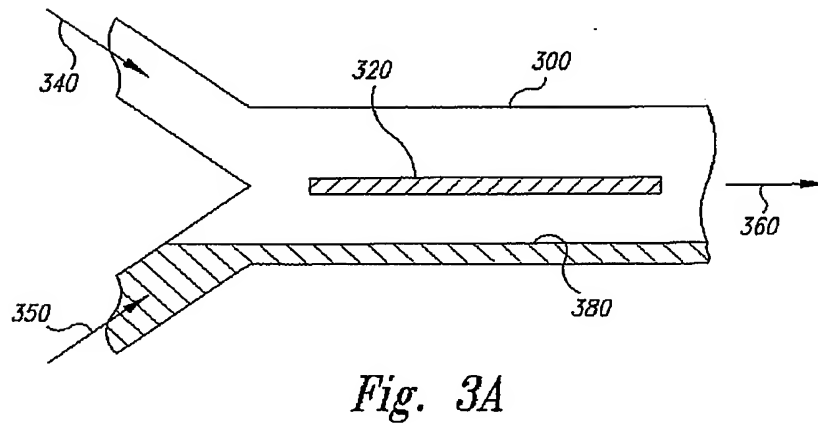


Fig. 2A

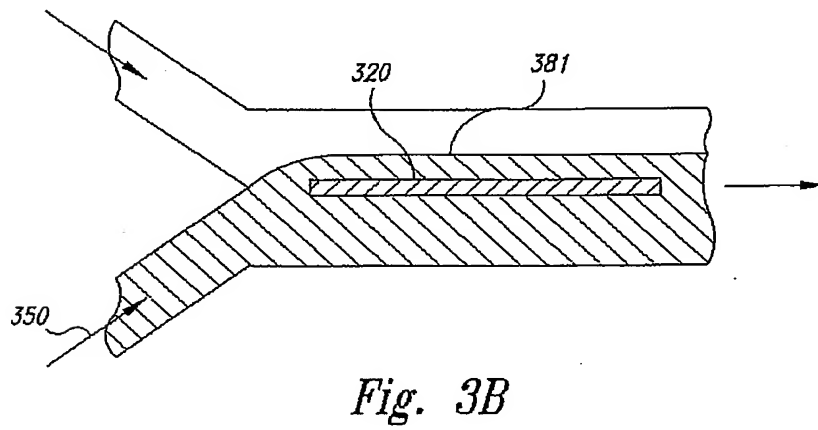
【図 2 B】



【図 3 A】



【図 3 B】





【図4A】

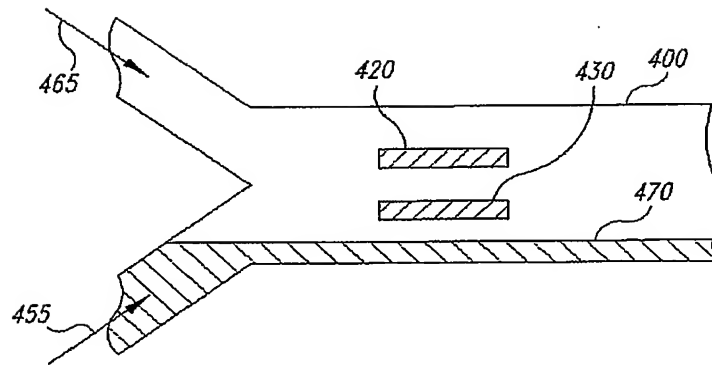


Fig. 4A

【図4B】

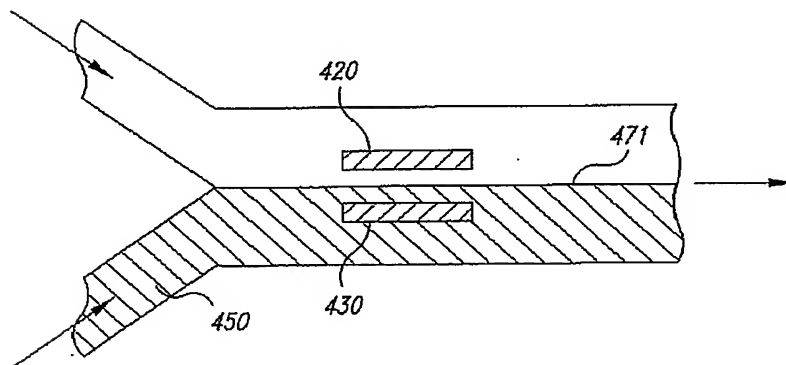


Fig. 4B

【図5A】

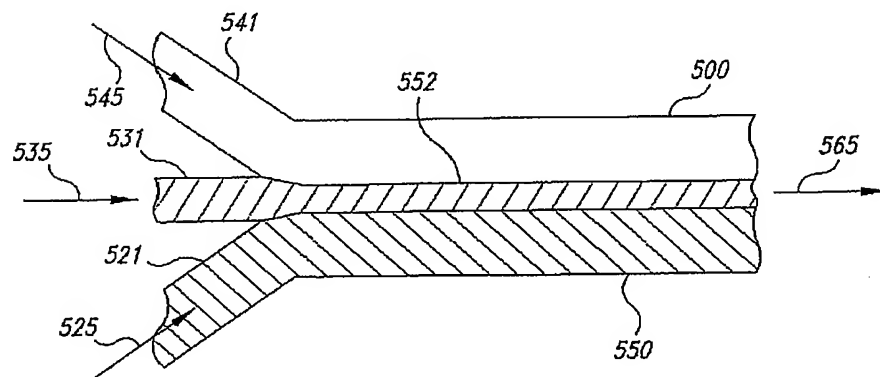


Fig. 5A

【図5B】

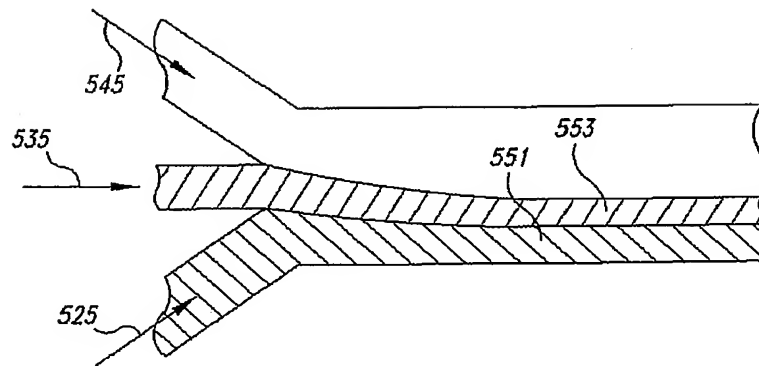
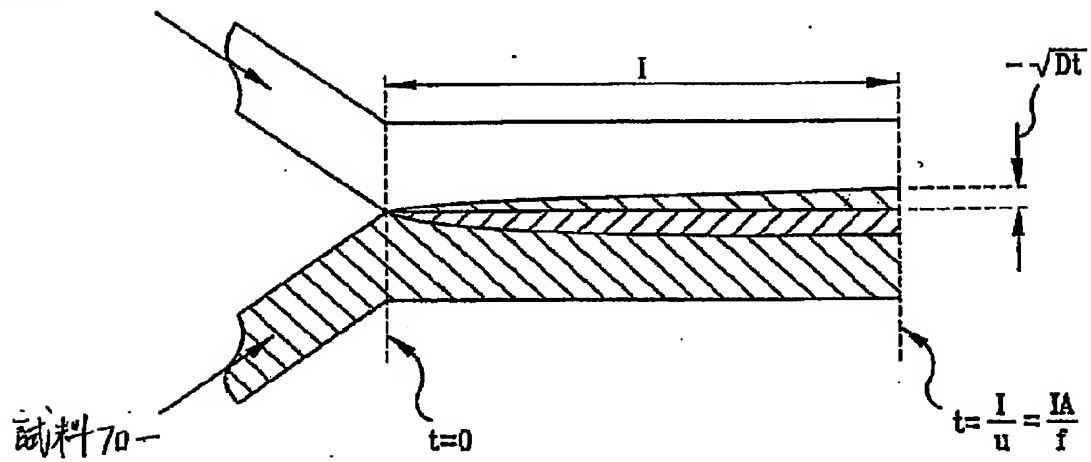
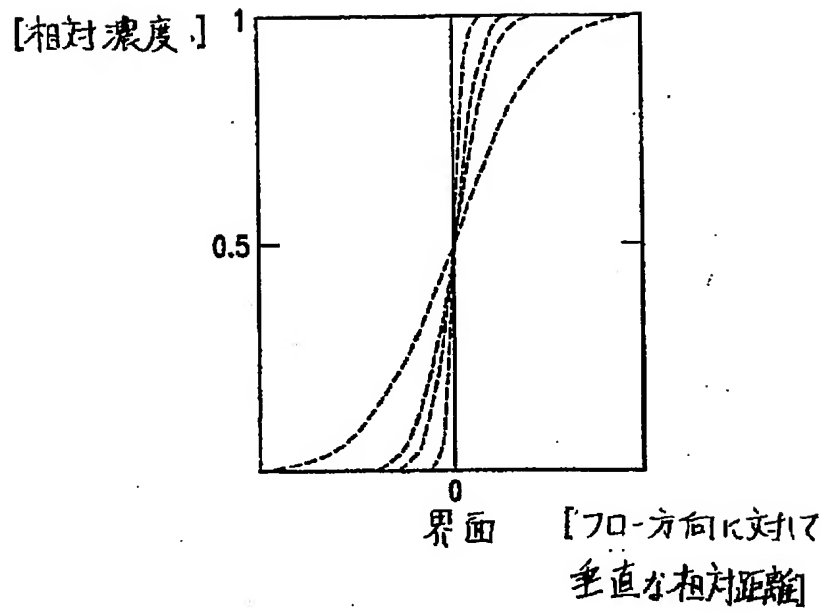


Fig. 5B

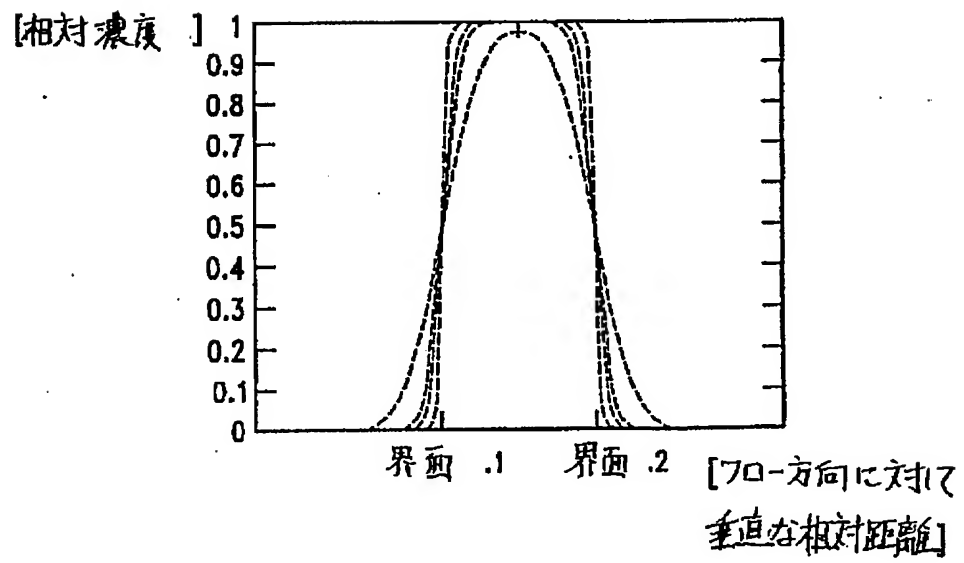
【図6】



【図7A】



【図7B】



【図 8】

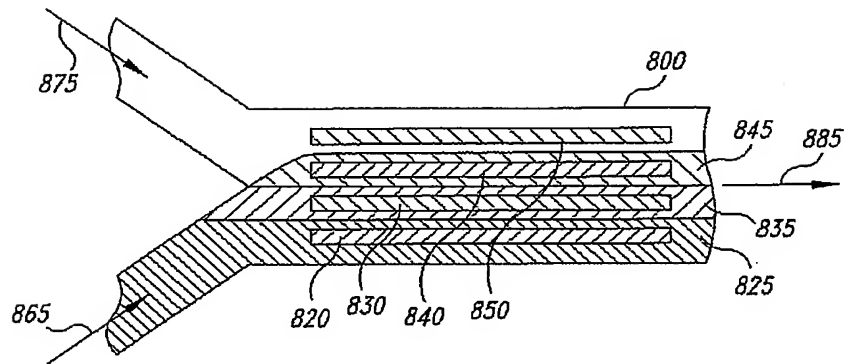


Fig. 8

【図 9】

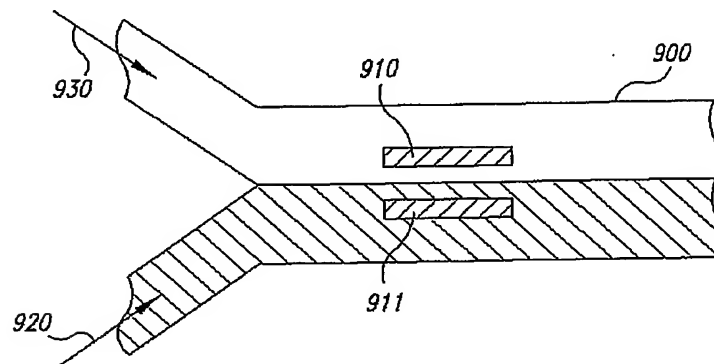


Fig. 9

【図 10】

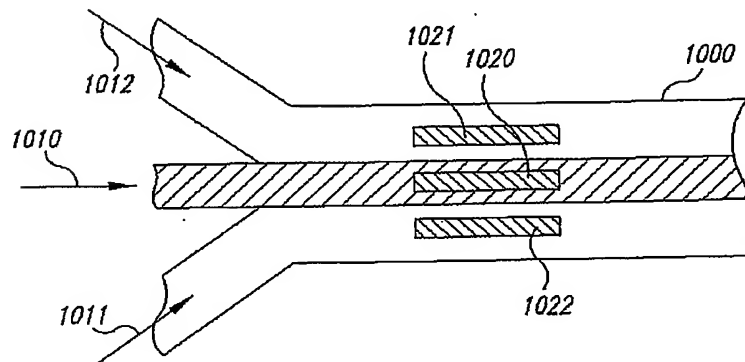


Fig. 10

【図 11A】

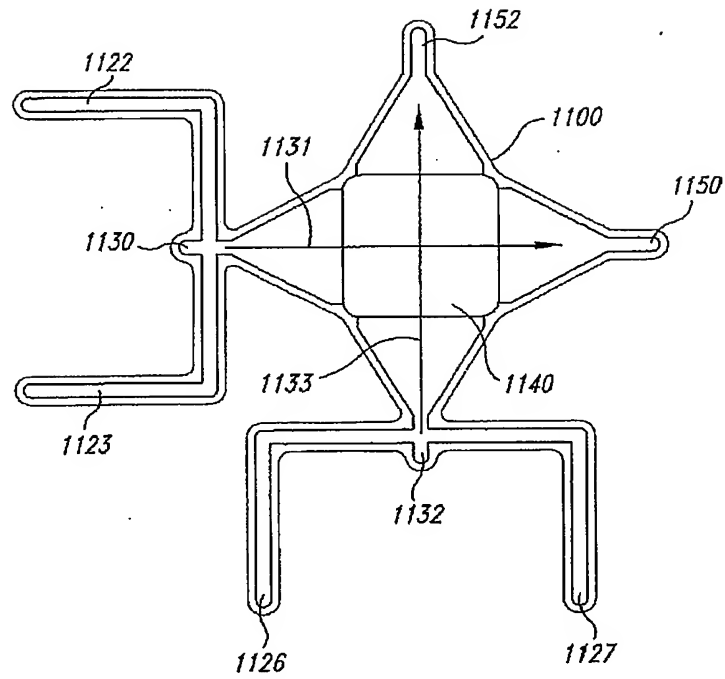


Fig. 11A

【図 11B】

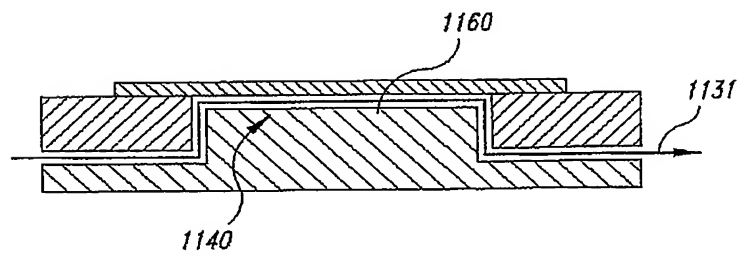


Fig. 11B

【図 12A】

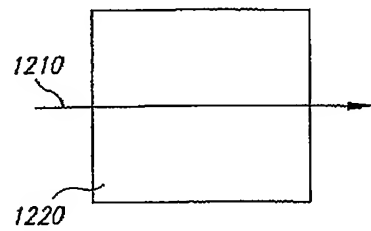
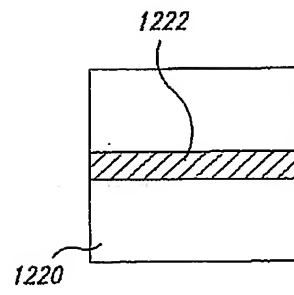
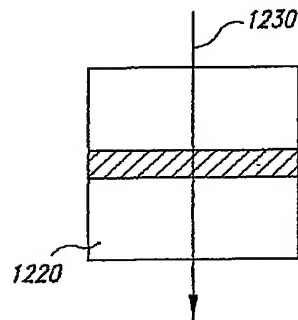


Fig. 12A

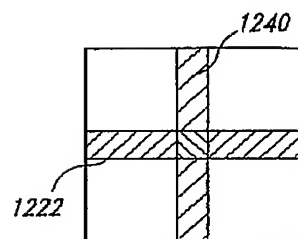
【図12B】

*Fig. 12B*

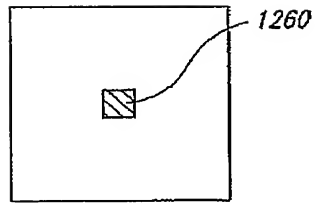
【図12C】

*Fig. 12C*

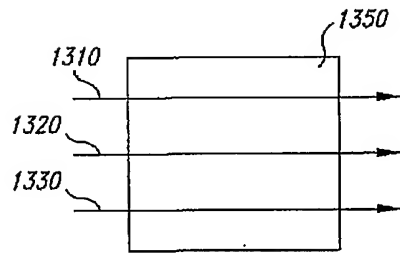
【図12D】

*Fig. 12D*

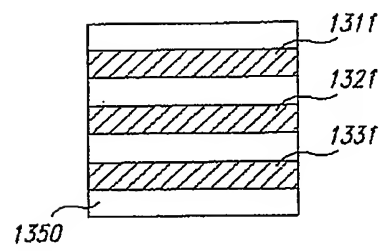
【図12E】

*Fig. 12E*

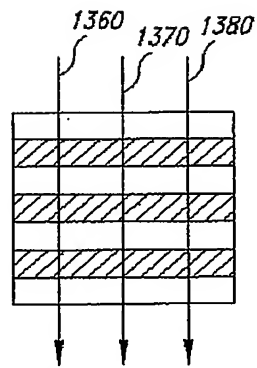
【図13A】

*Fig. 13A*

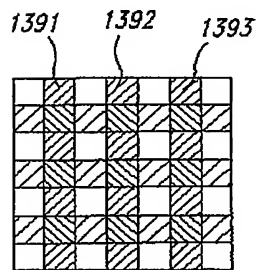
【図13B】

*Fig. 13B*

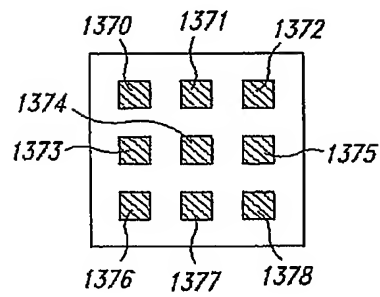
【図 13C】

*Fig. 13C*

【図 13D】

*Fig. 13D*

【図 13E】

*Fig. 13E*



【図14A】

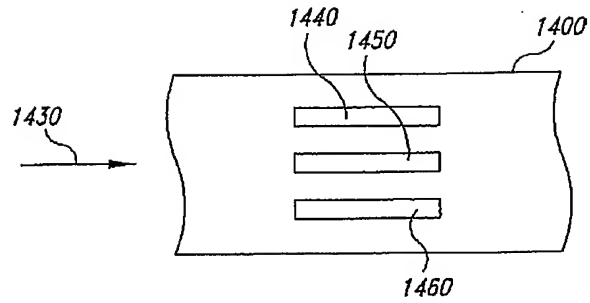


Fig. 14A

【図14B】

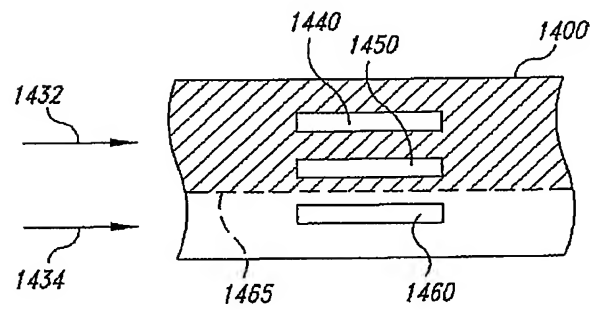


Fig. 14B

【図15】

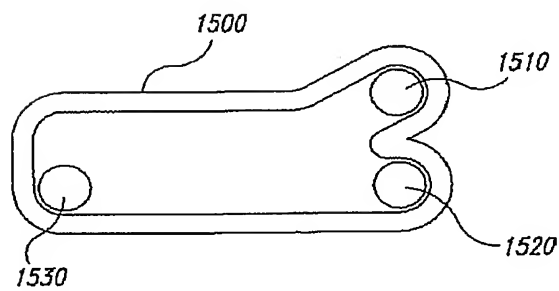
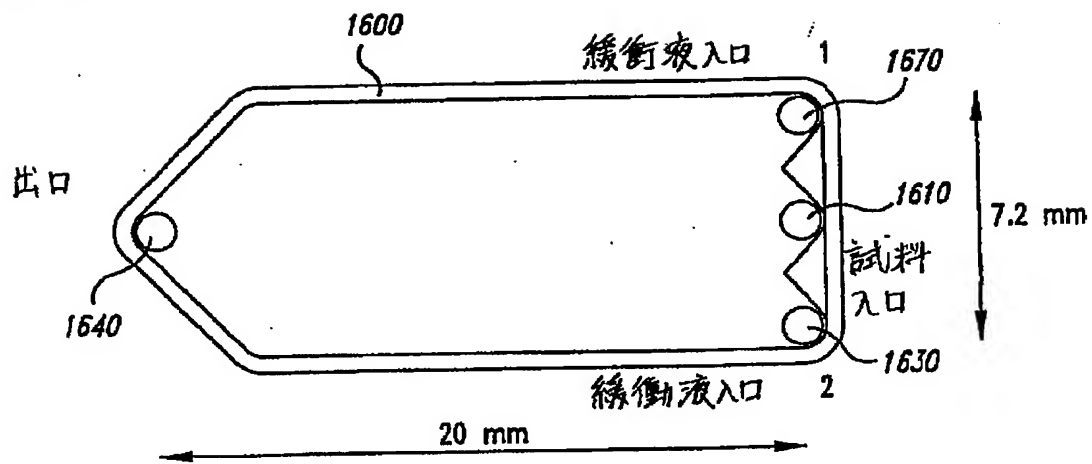
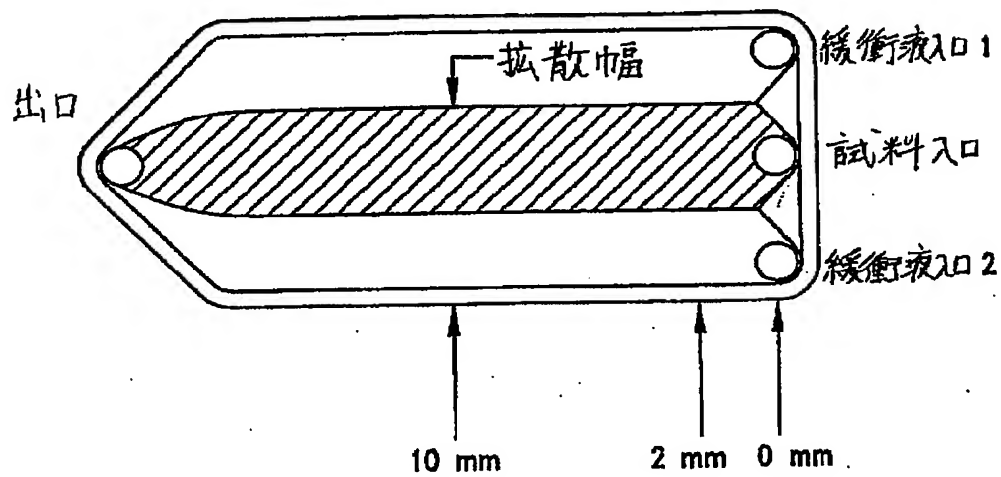


Fig. 15

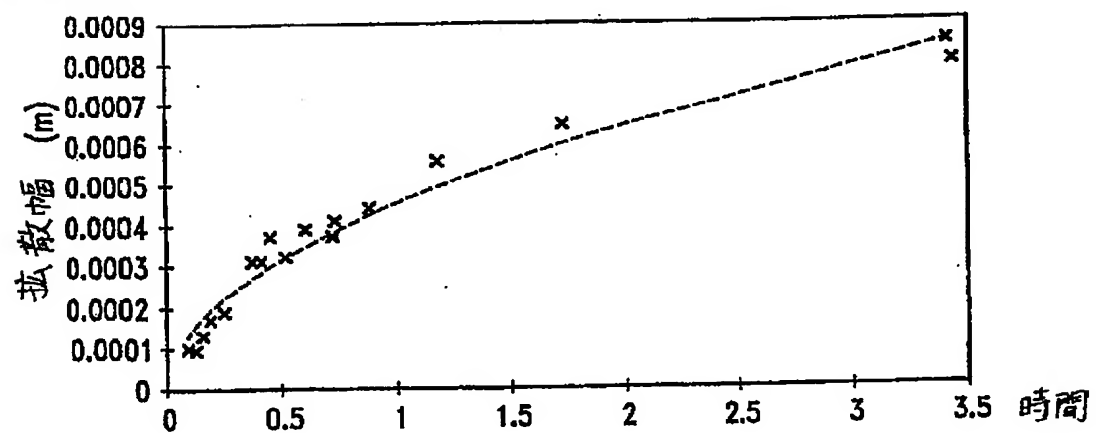
【図 16】



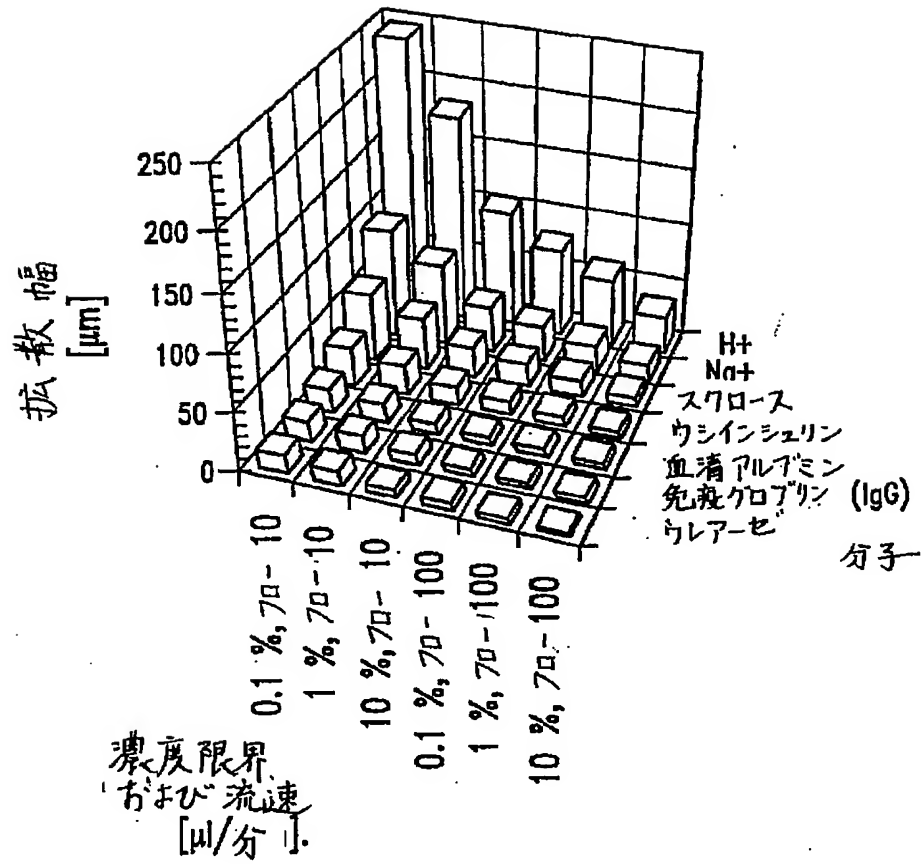
【図 17 A】



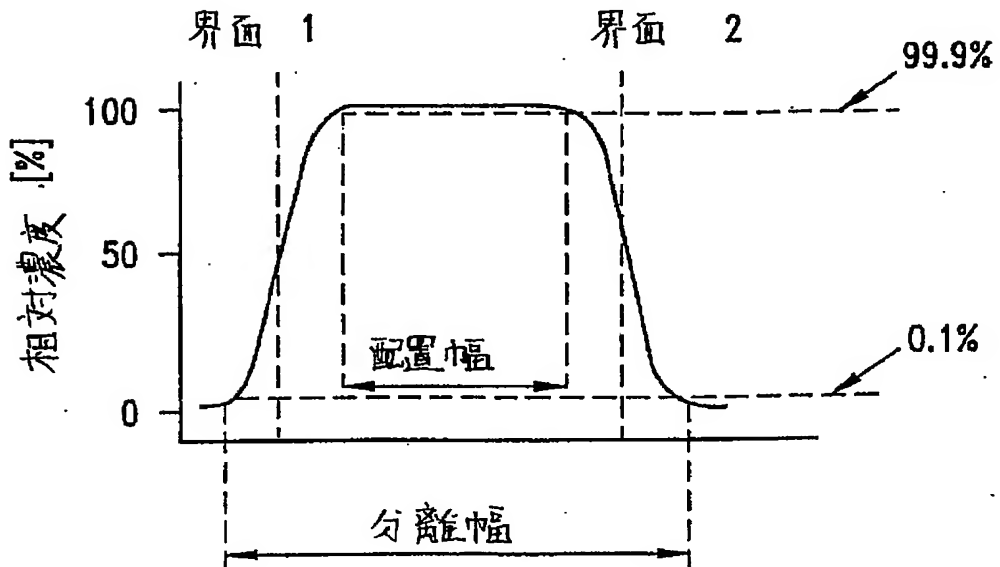
【図 17 B】



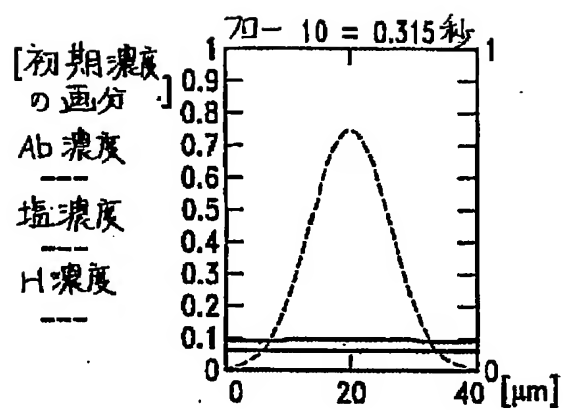
【図18】



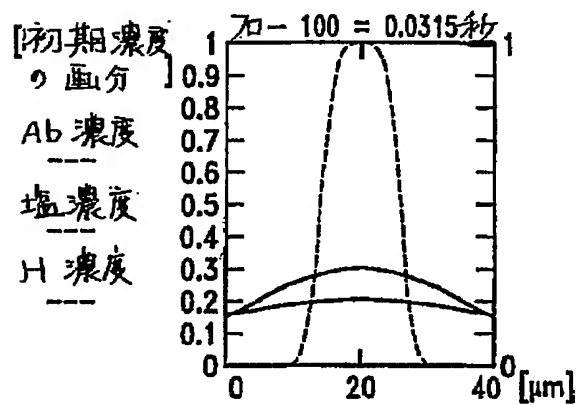
【図19】



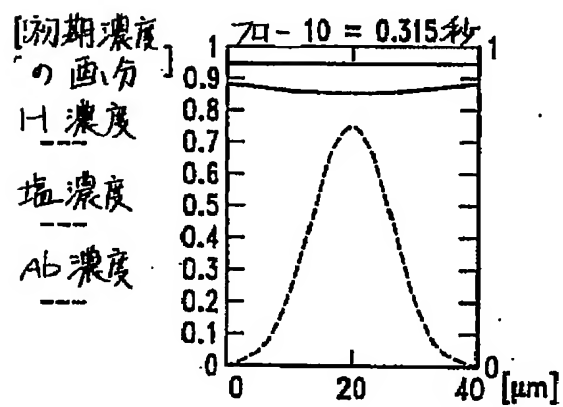
【図20A】



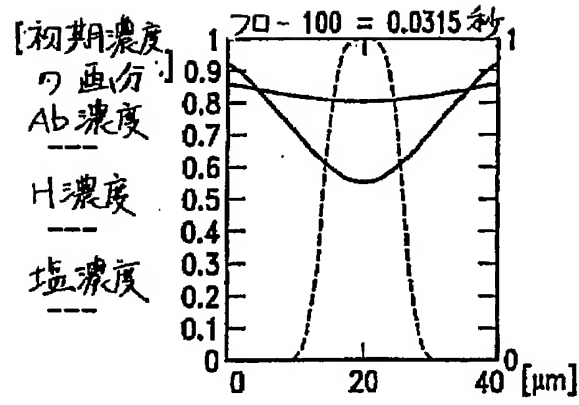
【図20B】



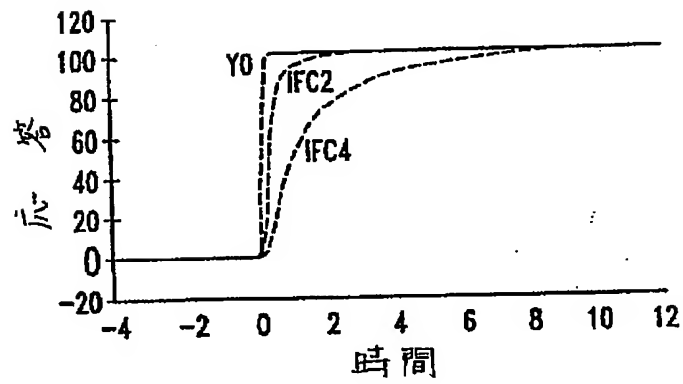
【図20C】



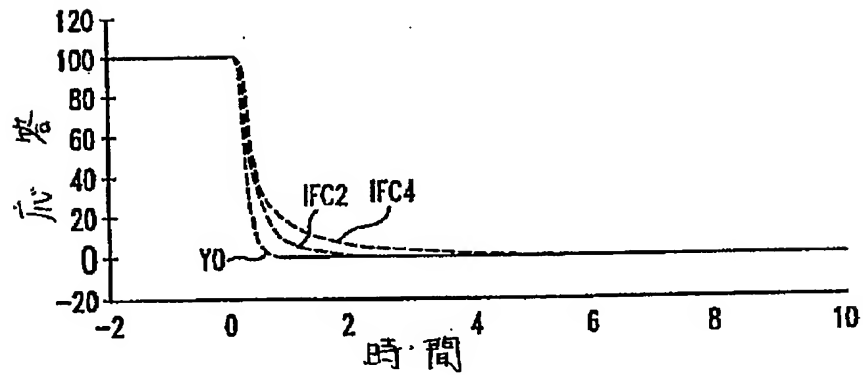
【図20D】



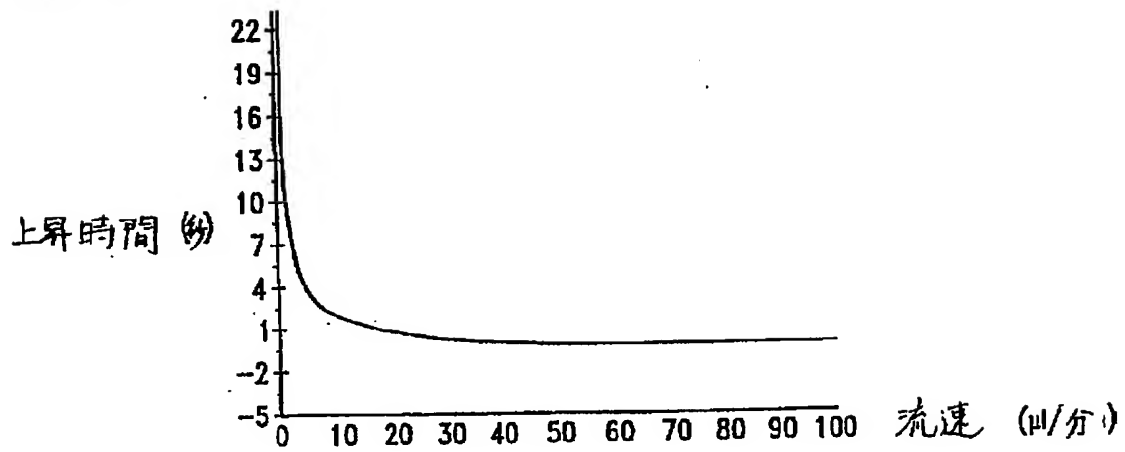
【図21A】



【図21B】

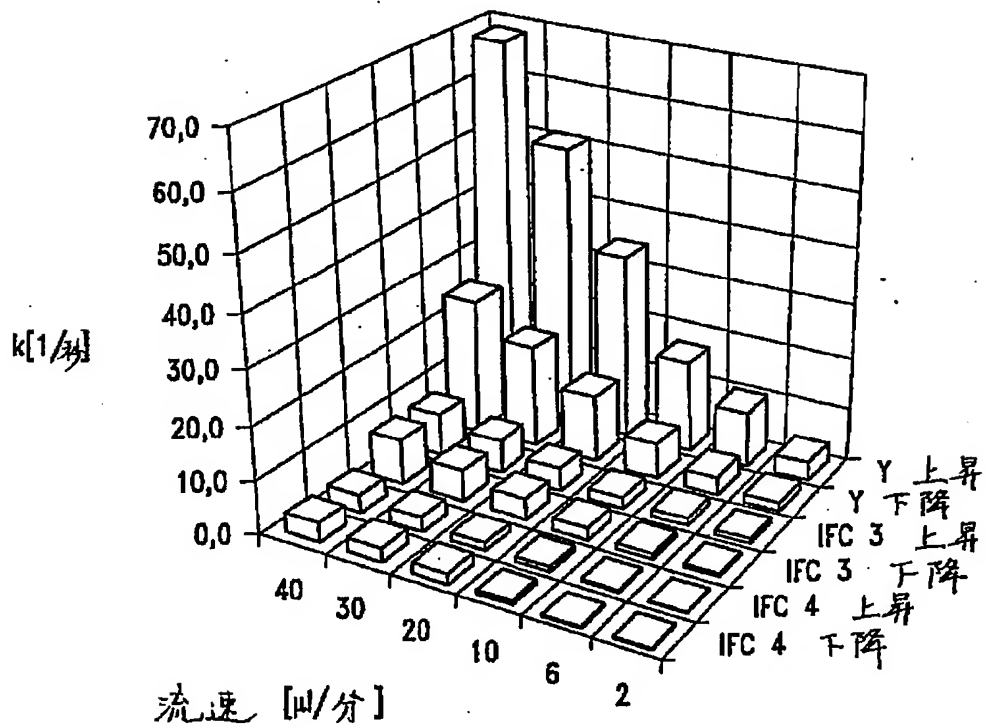


【图 21C】

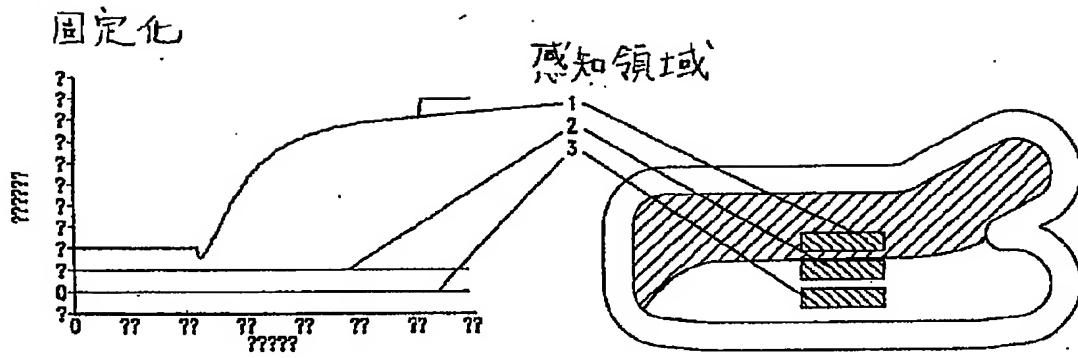


【图 22】

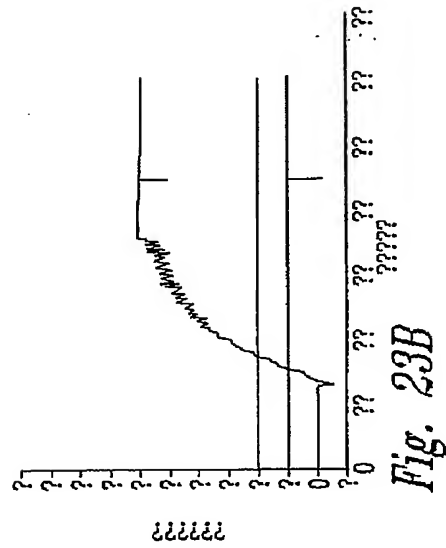
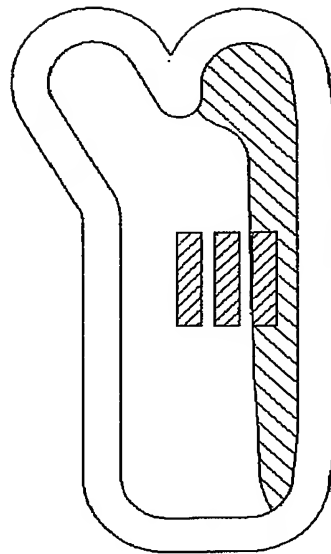
液体交換速度定数  $[1/\text{秒}]$



【図23A】

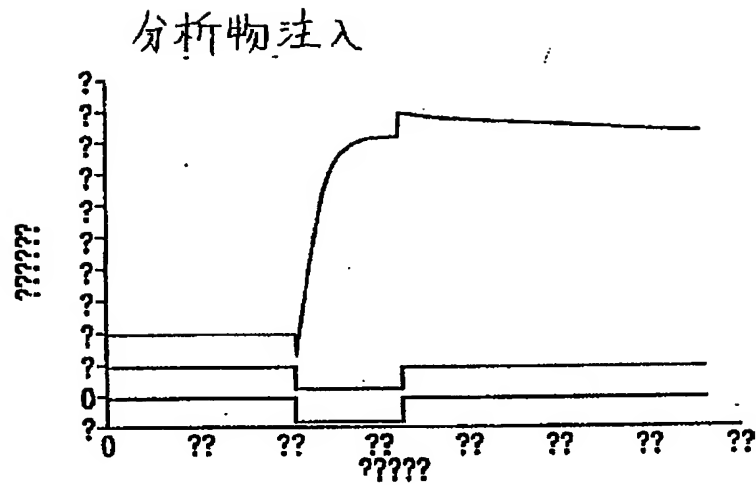


【図 23B】

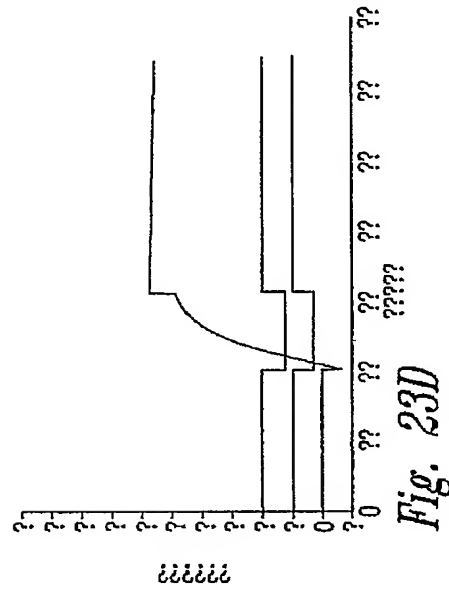




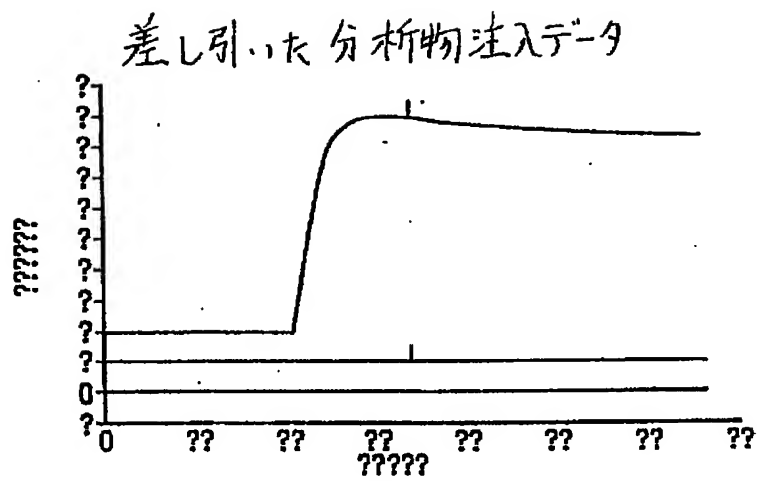
【图23C】



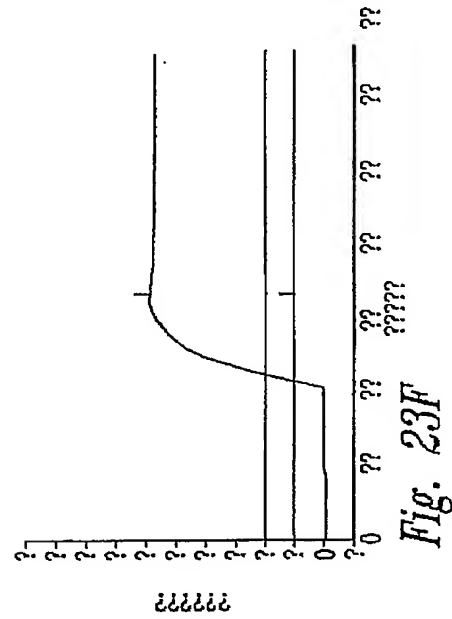
【图23D】



【図23E】



【図23F】



【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成12年3月8日(2000.3.8)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正内容】

【0011】

本発明は、これらの必要性を満たし、さらに関連した利点を提供する。

WO96/35940は、コロイド状ストリームおよび緩衝液ストリームの流動した個々の層流を使用して、波状案内層にコロイド状の金を堆積する方法を開示している。これらのコロイド状のストリームは、緩衝液のストリームにより、互いに分離される。これらのコロイド状ストリームは、この波状案内層にて、金コロイドストリップを堆積する。

WO97/01087は、流動可能試料を分析する方法を開示している。試料流体は、入口ポートから出口ポートに向かって流れ、そして参照流体は、他の入口ポートから同じ出口ポートに向かって流れ、これらのフロー方向は、互いに反対である。これらのフローの両方は、これらの2本のフローがはっきりした分割線または分割面で合流するように、層流である。これらの2本のフローストリームの間の分割線は、これらの2本のストリームの方向を横切り、そしてこれらの2本のストリームの相対流速を変えることにより、各個の入口ポートに向かってまたはそこから離れて移動し得る。別の実施態様は、複数の入口ポートを有するフローセルを開示しており、これは、試料および参照流体の一連の平行層流を形成する。参照フローは、これらの試料フローの間の隔壁として働く。流速は、これらの隔壁をずらすように、調整され得る。

## 【國際調查報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/SE 99/00063

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 G01N21/55 G01N21/05		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 G01N C23C		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X  Y	WO 96 35940 A (CIBA GEIGY AG ;BUDACH WOLFGANG (CH); NEUSCHAEFER DIETER (CH); PAWL) 14 November 1996  see page 2, line 5 - line 8 see page 5, line 6 - line 8 see page 5, line 29 - page 6, line 3 see page 6, line 30 - page 7, line 3 see page 11, line 19 - line 26 see page 18, line 21 - page 19, line 5 see page 20, line 22 - page 21, line 27 see page 22, line 10 - line 15 see page 26, line 15 - line 28 see page 32, line 17 - page 33, line 5 see figures 5,6  --- -/--	1-4,6,7, 9,10,17, 18,39-42 19,20, 43,44
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  23 April 1999		Date of mailing of the international search report  03/05/1999
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5018 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 940-3040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Navas Montero, E

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/SE 99/00063

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 01087 A (CIBA GEIGY AG ;OROSZLAN PETER (CH); ERBACHER CHRISTOPH (DE); DUVEN) 9 January 1997	21,22, 25-27, 31-33, 36-41 19,20
Y	see page 1, line 1 - line 6 see page 2, line 7 - line 12 see page 5, line 14 - line 20 see page 7, line 24 - page 8, line 2 see page 12, line 5 - line 19 see page 17, line 23 - page 19, line 18 see page 21, line 22 - page 22, line 2 see figures 8,9	
A	----	29,30
Y	WO 96 10178 A (PHARMACIA BIOSENSOR AB ;LOEFAAS STEFAN (SE)) 4 April 1996	43,44
A	see page 1, line 3 - line 6 see page 2, line 18 - line 24 see page 6, line 19 - page 7, line 22	1
A	WO 94 27137 A (UNIV UTAH RES FOUND) 24 November 1994 see the whole document	1

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No.

PCT/SE 99/00063

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9635940 A	14-11-1996	AU 5763296 A	29-11-1996
		CA 2219769 A	14-11-1996
		EP 0824684 A	25-02-1998
		PL 323257 A	16-03-1998
		ZA 9603731 A	12-11-1996
WO 9701087 A	09-01-1997	AU 6354796 A	22-01-1997
WO 9610178 A	04-04-1996	EP 0784793 A	23-07-1997
		JP 10507126 T	14-07-1998
WO 9427137 A	24-11-1994	US 5512492 A	30-04-1996
		AU 7311694 A	12-12-1994
		CA 2162996 A	24-11-1994
		EP 0700514 A	13-03-1996
		JP 8510331 T	29-10-1996
		US 5677196 A	14-10-1997
		US 5846842 A	08-12-1998

(72) 発明者      フェランダー， ステファン  
                     スウェーデン国 エス - 755 97 ウプサ  
                     ラ， ソルバッカ， フンボ（番地なし）

(72) 発明者      ティダーレ， マティアス  
                     スウェーデン国 エス - 752 26 ウプサ  
                     ラ， テグネルガータン 31 ベー

(72) 発明者      フェディン， ホーカン  
                     スウェーデン国 エス - 741 42 クニブ  
                     スタ， スタファンスベークン 30

(72) 発明者      ストルベルグ， ラルフ  
                     ノルウェー国 エヌ - 3800 ポ テーレマ  
                     ルク， トルシュトバイトベークン 6

F ターム(参考) 2G057 AA02 AB07 AC01 BA05 GA02

11